

GM50056

CB

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-174590

(43)公開日 平成10年(1998)6月30日

(51) Int.Cl.<sup>c</sup>  
 C 12 N 15/09  
 A 61 K 38/44  
     39/395  
     48/00  
 C 07 K 16/40

国別記号  
 ZNA  
 ABD  
 ADZ

F I  
 C 12 N 15/00  
 A 61 K 39/395  
     48/00  
 C 07 K 16/40  
 C 12 N 9/02

特許請求 未請求 請求項の範囲 FD 外国語出願 (全 96 頁) 優先权に渡く

(21)出願番号 特開平9-273231

(22)出願日 平成9年(1997)8月28日

(31)优先権主張番号 60/024845

(32)优先日 1996年8月28日

(33)优先権主張国 米国(US)

(71)出願人 591002957

スミスクライン・ビーチャム・コーポレイ  
ション  
SMITHKLINE BEECHAM  
CORPORATION  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406-  
0839、キング・オブ・ブルシア、スウェー  
ドランド・ロード703番

(72)発明者 ジョン・ティモシー・ロンズデイル  
アメリカ合衆国19341ペンシルベニア州エ  
クストン、エッジウッド・ドライブ407番

(74)代理人 弁理士 育山 篤 (外1名)

優先权に渡く

(54)【発明の名称】 FAB I

(57)【要約】

【課題】 FAB I のポリペプチドまたはFAB I に対する抗生物質の開発が望まれている。

【解決手段】 本発明は、原核生物FAB I ポリペプチドおよび該FAB I をコードするDNA (RNA) および組換え技術による該ポリペプチドの製造方法を、また、感染、例えば細菌感染を治療するための該FAB I の利用方法を開示する。さらに、FAB I に対するアンタゴニストおよび感染症、例えばスタフィロコッカス感染症を治療するための治療薬としてのそれらの使用、ならびに宿主におけるFAB I 核酸配列およびポリペプチドの存在に関連した病気を検出するための診断検定法を開示する。さらにまた、FAB I をコードするポリヌクレオチドの検出および宿主におけるポリペプチドの検出を目的とする診断的検定法も開示する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】(a)配列番号2のアミノ酸1～256を有してなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチド、

(b) (a)のポリヌクレオチドと相補的であるポリヌクレオチド、および

(c) (a)または(b)のポリヌクレオチドの少なくとも15の塩基を有してなるポリヌクレオチドからなる群から選択された1成分を有してなる単離ポリヌクレオチド。

【請求項2】ポリヌクレオチドがDNAである請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】ポリヌクレオチドがRNAである請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】配列番号1に示されたヌクレオチド1～771を有してなる請求項2記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】配列番号2に示されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチドを有してなる請求項2記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】配列番号2のアミノ酸1～256を有してなるポリペプチドをコードする請求項2記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】(a)NCIMB受託番号40771に含まれるcDNAにより発現される同じ成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチド、

(b) (a)のポリヌクレオチドと相補的であるポリヌクレオチド、および

(c) (a)または(b)のポリヌクレオチドの少なくとも15塩基を有してなるポリヌクレオチドからなる群から選択された1成分を有してなる単離ポリヌクレオチド。

【請求項8】請求項2に記載のDNAを有してなるベクター。

【請求項9】請求項8に記載のベクターを有してなる宿主細胞。

【請求項10】上記DNAによりコードされるポリペプチドを請求項9記載の宿主細胞から発現させることからなる、ポリペプチドの製造方法。

【請求項11】細胞がベクターに含まれるcDNAによりコードされるポリペプチドを発現するように、細胞を請求項8に記載のベクターで形質転換または形質導入することからなる、ポリペプチドを発現する細胞の製造方法。

【請求項12】配列番号2のアミノ酸1～256と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有してなるポリペプチド。

【請求項13】配列番号2に示されたアミノ酸配列を有してなるポリペプチド。

【請求項14】請求項12に記載のポリペプチドに対する抗体。

【請求項15】請求項12記載のポリペプチドの活性を阻害するアンタゴニスト。

【請求項16】FAB Iを必要とする個体の治療方法であって、請求項12のポリペプチドの治療有効量を該個体に投与することからなる方法。

【請求項17】ポリペプチドをコードするDNAを個体に与え、インビボで該ポリペプチドを発現させることにより治療有効量のポリペプチドを投与する請求項16記載の方法。

【請求項18】FAB Iポリペプチドの阻害を必要とする個体の治療方法であって、請求項15のアンタゴニストの治療有効量を該個体に投与することからなる方法。

【請求項19】請求項12のポリペプチドの発現に関連した疾患の診断方法であって、該ポリペプチドをコードする核酸配列を測定することからなる方法。

【請求項20】宿主から誘導された試料における請求項12のポリペプチドの存在について分析することからなる診断方法。

【請求項21】請求項12のポリペプチドに結合し、その活性を阻害する化合物の同定方法であって、細胞表面でポリペプチドに対する結合部位（該結合部位は該結合部位への化合物の結合に応じて検出可能なシグナルを提供し得る第2成分に結合するものである）を発現する細胞を、結合部位に結合させ得る条件下でスクリーニングされる化合物と接触させ、結合部位と化合物の相互作用から発せられるシグナルの

30 存在または非存在を検出することにより、化合物が結合部位に結合し、それを活性化するか阻害するかを測定することからなる方法。

【請求項22】哺乳類における免疫応答の誘導方法であって、抗体を産生させ、該哺乳類をスタフィロコッカスによる感染から防御するのに十分なFAB Iまたはそのフラグメントまたは変種を哺乳類に接種することからなる方法。

【請求項23】哺乳類における免疫応答の誘導方法であって、遺伝子治療を介して、FAB Iフラグメントまたはその変種をコードする遺伝子を送達し、FAB Iまたはそのフラグメントまたは変種をインビボで発現させることにより、免疫応答を誘導し、抗体を産生させて、該動物を疾患から防御することからなる方法。

【請求項24】哺乳類宿主中に導入されると、所定のFAB Iポリヌクレオチドまたはそこからコードされるタンパク質に対しその哺乳類において免疫応答を誘導する免疫学的組成物であって、組換えFAB Iポリヌクレオチドまたはそこからコードされるタンパク質の抗原をコードし、発現するDNAを有してなる該FAB I

50 ポリヌクレオチドまたはそこからコードされるタンパク

質を有してなる組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一つには、新たに同定されたポリヌクレオチドおよびポリペアチド、これらのポリヌクレオチドおよびポリペアチドの変種および誘導体、これらのポリヌクレオチドおよびこれらのポリペアチドおよびそれらの変種および誘導体の製造方法、ポリペアチドのアゴニストおよびアンタゴニスト、ならびにこれらのポリヌクレオチド、ポリペアチド、変種、誘導体、アゴニストおよびアンタゴニストの使用に関するものである。特に、これらおよび他の点について、本発明は、以後「FAB I」と称される、スタフィロコッカスFab Iエノイル-ACPレダクターゼのポリヌクレオチドおよびポリペアチドに関するものである。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】飽和脂肪酸合成の全体的経路はどの生物体でも同様であるが、脂肪酸シンターゼ(FAS)系は、それらの構造組織の点でかなり異なる。すなわち、脊椎動物および酵母から見いだされるI型FAS系では、脂肪酸合成に要求される必要な酵素は、各々、1または2本のポリペアチド鎖に存在する。反対に、ほとんどの細菌および植物から見いだされるII型系では、経路の各工程は別々の単機能酵素により触媒される。従って、細菌および哺乳類の酵素の阻害を有意に選択することが可能であると思われる。

【0003】Fab I(以前はEnvMと呼ばれた)は、細菌による脂肪酸合成の各サイクルに関与する4工程の反応の最終工程でエノイルアシル担体タンパク質(ACP)レダクターゼ(バーグラーら、(1994)、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」(J.Biol.Chem.)、269、5493-5496)として機能する。

【0004】第一工程は $\beta$ -ケトアシル-ACPシンターゼにより触媒され、マロニル-ACPをアセチル-C<sub>6</sub>Aと縮合させる(FabH、シンターゼIII)。その後の過程で、マロニル-ACPは、成長鎖アシル-ACPと縮合される(FabBおよびFabF、各々、シンターゼIおよびII)。

【0005】延長サイクルにおける第二工程は、NADPH-依存性 $\beta$ -ケトアシル-ACPレダクターゼ(FabG)によるケトエステル還元である。その後、 $\beta$ -ヒドロキシアシル-ACPデヒドロゲナーゼ(FabAまたはFabZのいずれか)による脱水により、トランス-2-エノイル-ACPが誘導され、今度はNADH-依存性エノイル-ACPレダクターゼ(FabI)によりアシル-ACPに変換される。このサイクルのさらなる過程では、1サイクルにつき2個の炭素原子が付加されて、結局はバルミトイール-ACP(16C)が誘導さ

れ、そこでこのサイクルは、大きくはバルミトイール-ACPがFab Iをフィードバック阻害するが故に止められる(ヒースら、(1996)、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」(J.Biol.Chem.)、271、1833-1836)。従って、Fab Iは、全体的合成経路において鍵となる調節点でもある主要生合成酵素である。

【0006】初期のデータは、エシェリヒア・コリ(E.coli)には2種のエノイル-ACPレダクターゼが存在し、一方はNADPH依存性であり、他方はNADH依存性であることを示唆していた。しかしながら、最近の研究からは、NADPH依存性酵素に関する証拠は発見されておらず、Fab Iがエシェリヒア・コリ(E.coli)から同定された唯一のエノイル-ACPレダクターゼである(ヒースら、(1995)、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」(J.Biol.Chem.)、270、26538-26542、バーグラーら、(1994)、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」(J.Biol.Chem.)、269、5493-5496)。

【0007】ジアザボリン抗生物質が、脂肪酸、磷脂質およびリボ多糖類(LPS)の合成を阻害し、また、これらの化合物の抗菌性標的がFab Iであることもわかった。例えばグラスバーガーら、(1984)、「ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー」(J.Med.Chem.)、27、947-953による誘導体2b18は、Ki=0.2ミリモルを有するFab Iの非競合的阻害剤であることがわかった(バーグラーら、(1994)、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」(J.Biol.Chem.)、269、5493-5496)。グラム陰性およびグラム陽性菌に対するジアザボリン誘導体の抗菌活性は、文献で詳細に報告されている(グラスバーガーら、「ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー」(J.Med.Chem.)、1984、27、947-953; グロノヴィッツら、「アクタ・ファルム・スエシカ」(Acta Pharo Suecica)、1971、8377; ワーシュラ、米国特許第2533918号; ラムら、「ジャーナル・オブ・アンチミクロバイアル・ケモセラピー」(J.Antimicrob.Chemother.)、1984、7、20、37-45)。

【0008】条件的致死Fab I突然変異体はエシェリヒア・コリ(E.coli)で構築され、サルモネラ・ティフィムリウム(Salmonella typhimurium)由来のFab I遺伝子がこの突然変異を完全なものにする。加えて、ジアザボリン耐性サルモネラ・ティフィムリウム(S.typhimurium)からのFab I遺伝子を含むアラスミドが、エシェリヒア・コリ(E.coli)においてジアザボリン耐性を付与し(ツルノブスキーら、(1989)、「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー」(J.Bacteriol.)、171、6555-6565)、Fab Iがジアザボリ

ンの抗菌性標的として確認された。

【0009】ジアザボリンまたはFab I温度感受性突然変異体での温度を非許容条件に上昇させることによるFab Iの阻害は致死的であるため、Fab Iが生物の生存にとって不可欠であることが証明されている（バーグラーら、(1994)、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」(J.Biol.Chem.)、269、5493-5496）。実験室で誘発されたFab I遺伝子における点突然変異により、ジアザボリン耐性エシェリヒア・コリ(E.coli)が誘導される。

【0010】Fab Iは、グラム陰性菌中に、エシェリヒア・コリ(E.coli)およびサルモネラ・ティフィムリウム(S.typhimurium)Fab I間で98%の同一性(バーグラーら、(1992)、「ジャーナル・オブ・ジェネラル・マイクロバイオロジー」(J.Gen.Microbiol.)138,2093-2100)ならびにこれらのタンパク質およびヘモフィルス・インフルエンゼ(H.influenzae)Fab I間で75%の同一性を有して保存されている。本発明のスタフィロコッカス・アウレウス(S.aureus)FAB Iは、マイコバクテリウム・ツベルクリシス(M.tuberculosis)を含むマイコバクテリア全体に高度保存されているマイコバクテリア性タンパク質、InhAと54%の類似性を示す。エシェリヒア・コリ(E.coli)Fab Iは、ブラッシカ・ナップス(Brassica napus)(菜種)エノイル-ACPレダクターゼとは34%の同一性、57%の類似性を示すことが見いだされ、本発明のスタフィロコッカス・アウレウス(S.aureus)FAB Iもまた34%の同一性、57%の類似性を示した。さらに、本発明のFAB Iは、エシェリヒア・コリ(E.coli)とは252アミノ酸にわたって44%の同一性、64%の類似性を有することが見いだされた。本発明のFAB Iは、哺乳類2,4-ジエノイル-補酵素Aレダクターゼとの同一性は27%に過ぎず、類似性は48%である。この哺乳類相同体は、それが多不飽和エノイル-CoAのβ-酸化に関与し、補因子としてNADHではなくNADPHを利用するという点でFAB Iとは異なる。従って、FAB Iの選択性には重要な可能性がある。脂肪酸合成に対して標的とされる抗生物質は市販されていないため、FAB Iの阻害剤は、現在の抗生物質耐性機構に対して感受的でないと思われる。さらに、これは潜在的な広域スペクトル標的である。

【0011】新規種類の抗生化合物の開発が依然として要望されている。明らかに、抗生作用について化合物をスクリーニングする、例えばFASの阻害剤をスクリーニングするための単純な高スループット検定に使用され得る因子、例えばFAB Iが要望されている。また上記因子を用いることにより、感染、機能不全および疾病の発病におけるそれらの役割が決定され得る。感染、機能不全または疾病の予防、改善および治療においてある役割を果たし得るかかる因子の同定および特性検定は、ヒ

トの健康を改善するための重要な発見を為す際の臨界的工程である。

#### 【0012】

【課題を解決するための手段】これらおよびその他の目標に向かって、本発明の目的は、特に、図1に示されたアミノ酸配列〔配列番号2〕および他のタンパク質、例えばエシェリヒア・コリ(E.coli)Fab Iエノイル-ACPレダクターゼおよび前記のものの既知アミノ酸配列間の相同意により新規FAB Iとして同定されたポリペプチドを提供することである。

【0013】さらに、本発明の別の目的は、FAB Iをコードするポリヌクレオチド、特に本明細書でFAB Iと称されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することである。本発明のこの態様の特に好みしい具体例では、ポリヌクレオチドは、図1に示された配列〔配列番号2〕においてFAB Iをコードする領域を有する。

【0014】本発明の別の特に好みしい態様は、配列番号2のアミノ酸配列またはそのフラグメント、類似体もしくは誘導体を有してなるスタフィロコッカス・アウレウス(S.aureus)WCUH29由来の新規FAB Iタンパク質である。本発明のこの態様によると、NCIMB受託番号40771に含まれるスタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)WCUH29株により発現され得る成熟ポリペプチドをコードする単離核酸分子が提供される。

【0015】本発明のこの態様によると、mRNA、cDNA、ゲノムDNAを含むFAB I、特にスタフィロコッカスFAB Iをコードする単離核酸分子が提供され、本発明のこの態様の別の具体例では、生物学的、診断的、臨床的または治療的に有用なその変種、類似体または誘導体または、変種、類似体および誘導体のフラグメントを含むそのフラグメントが提供される。本発明のこの態様の特に好みしい具体例の中には、天然に存在するFAB Iの対立遺伝子変異体が含まれる。

【0016】本発明のこの態様によると、本明細書でFAB Iと称されるスタフィロコッカス起源の新規ポリペプチド並びに生物学的、診断的または治療的に有用なそのフラグメント、変種および誘導体、前記フラグメントの変種および誘導体、および前記のものの類似体が提供される。

【0017】本発明の目的はまた、FAB Iポリペプチド、特に治療目的、例えば、感染症、例えば上気道感染(例、中耳炎、細菌性気管炎、急性喉頭蓋炎、甲状腺炎)、下気道感染(例、蓄膿症、肺膿瘍)、心臓感染(例、感染性心内膜炎)、消化器感染(例、分泌性下痢、脾臓腫瘍、腹膜後腫瘍)、CNS感染(例、脳膜炎)、眼感染(例、眼瞼炎、結膜炎、角膜炎、眼内炎、前房膜および眼窩蜂巢炎、涙腺炎)、腎および泌尿管感染(例、副睾丸炎、腎内および腎周囲腫瘍、トキシック

ショック症候群)、皮膚感染(例、膿瘍疹、毛包炎、皮膚隕瘍、蜂巣炎、外傷感染、細菌性筋炎)ならびに骨および関節感染(例、敗血性関節炎、骨髓炎)を含む(ただし、これらに限定されるわけではない)スタフィロコッカス感染に対する宿主免疫性を付与することによる治療を含む、疾患の治療に使用され得るFAB Iポリペプチドを提供することである。

【0018】本発明のさらに別の態様によると、治療または予防を目的とする、例えば抗菌剤またはワクチンとしての本発明ポリペプチドの使用が提供される。本発明の別の態様によると、治療または予防を目的とする、特に遺伝子免疫化に関する本発明ポリヌクレオチドの使用が提供される。本発明のこの態様の特に好ましい具体例には、FAB I遺伝子の自然に存在する対立遺伝子によりコードされるFAB Iポリペプチドの変種がある。

【0019】本発明の別の目的は、前記のポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、変種および誘導体、変種および誘導体のフラグメントならびに前記のものの類似体の製造方法を提供することである。本発明のこの態様の好ましい具体例では、宿主におけるFAB I発現条件下で外性誘導のFAB Iコードポリヌクレオチドをそこに発現可能な形で組み込ませた宿主細胞を培養し、次いで発現されたポリペプチドを採取することを含む前記のFAB Iポリペプチドの製造方法が提供される。

【0020】本発明の別の目的によると、特に研究、生物学的、臨床的および治療的目的に前記のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを利用する生成物、組成物、プロセスおよび方法が提供される。本発明のさらに別の態様によると、抗菌剤として有用な、上記ポリペプチドに対する阻害剤が提供される。特に、上記ポリペプチドに対する抗体が提供される。

【0021】本発明のこの態様の若干の好ましい具体例によると、中でも特に、FAB IポリペプチドまたはFAB IコードmRNAを検出することにより細胞でのFAB I発現を評価し、前記で開示されたFAB Iポリペプチドまたはポリヌクレオチドに細胞を曝すことによりインビトロ、エクスピボまたはインビボでの細菌感染を治療し、FAB I遺伝子における遺伝子変異および染色体異常、例えば欠失を検定し、および生物体にFAB Iポリペプチドまたはポリヌクレオチドを投与して、細菌、例えばスタフィロコッカスに対する免疫応答を生じさせるための生成物、組成物および方法が提供される。

【0022】本発明のこの態様および他の態様の若干の好ましい具体例によると、FAB I配列とハイブリッド形成するアローブが提供される。本発明のこの態様の若干のさらに好ましい態様では、FAB Iポリペプチドに対する抗体が提供される。これについて若干の特に好

ましい具体例では、抗体はFAB Iに関して高度選択性である。

【0023】本発明の別の態様によると、FAB Iアゴニストが提供される。好ましいアゴニストにはFAB Iを模倣する分子があり、それらはFAB I結合性分子または結合性分子に結合し、FAB I誘導応答を引き出すかまたは増大させる。好ましいアゴニストには、FAB I分子またはFAB I活性の他のモジュレーターと相互作用することにより、FAB Iの一効果またはFAB Iの複数効果を強化または増大させる、静菌性または殺菌性の分子がある。

【0024】本発明のさらに別の態様によると、FAB Iアンタゴニストが提供される。好ましいアンタゴニストには、FAB Iを模倣するものがあり、それらはFAB I結合性分子に結合するが、一FAB I誘導応答または複数のFAB I誘導応答を引き出すことはしない。また、好ましいアンタゴニストには、FAB Iと結合または相互作用することにより、FAB Iの一効果またはFAB Iの複数効果を阻害するかまたはFAB Iの発現を阻止する分子がある。FAB Iのさらに特に好ましいアンタゴニストは、FAB I酵素活性(複数も可)を低下または滅滅させる。

【0025】本発明の別の態様では、インビトロ細胞、エクスピボ細胞およびインビボ細胞または多細胞生物体に投与されるFAB IポリヌクレオチドまたはFAB Iポリペプチドを含む組成物が提供される。本発明のこの態様の若干の特に好ましい具体例では、組成物は、宿主生物においてFAB Iポリペプチドを発現させ、免疫応答を上昇させる、好ましくは細菌、好ましくはスタフィロコッカスまたは密接な遺伝子的関連生物体に対して上記宿主における免疫性を上昇させるFAB Iポリヌクレオチドを含む。

【0026】本発明の他の目的、特徴、利益および態様は、下記の記載事項から熟練者にとっては明白なものとなるはずである。しかしながら、以下の記載および実施態様は本発明の好ましい具体例を示すものであって、単なる説明にすぎないものと理解すべきである。開示された発明の精神および範囲内での様々な変化および修正については、当業界の熟練者であれば、以下の記載を読み、本明細書の他の部分を読むことにより容易に理解できるはずである。

#### 【0027】用語説明

以下、本明細書、特に実施例において頻繁に使用されている若干の用語を理解し易くするために説明を行う。これらの説明は、都合上記載されたもので、本発明を制限するものではない。

【0028】本明細書で使用されている「結合性分子」は、例えば酵素基質および基質および補因子模擬物質ならびに古典的レセプターを含む、本発明のFAB Iポリペプチドまたはポリヌクレオチドと特異的に結合また

は相互作用する分子またはイオンを包含する（これらはまた、それぞれ「結合性分子」および「相互作用分子」と、および「FAB-I結合性分子」および「FAB-I相互作用分子」と称することができる）。本発明のポリペプチドおよび結合性または結合性または相互作用分子を含む上記分子間の結合は、本発明ポリペプチドに限定的であり得るか（これは極めて好ましい）、または本発明ポリペプチドに対して高特異的であり得るか（これは非常に好ましい）、または本発明のポリペプチドを含む一群のタンパク質に高特異的であり得るか（これは好ましい）、または幾つかの群のタンパク質に特異的であって、そのうちの少なくとも1種に本発明ポリペプチドが含まれる場合があり得る。

【0029】結合性分子はまた、自然には存在しないもの、例えば本発明ポリペプチドに特異的に結合する抗体および抗体誘導試薬であり得る。「DNAの消化」は、DNAにおける一定の配列でのみ作用する制限酵素によるDNAの開裂を指す。ここに示されている様々な制限酵素は市販されており、それらの反応条件、補因子および他の使用必要事項は公知であり、熟練者には常用的なものである。

【0030】分析目的の場合、典型的には、 $1\mu\text{g}$ のプラスミドまたはDNAフラグメントを、約20 $\mu\text{l}$ の反応緩衝液中約2単位の酵素で消化する。プラスミド構築用にDNAフラグメントを単離する目的の場合、典型的には5~50 $\mu\text{g}$ のDNAを、20~250単位の酵素により比例的に大きな容量で消化する。特定制限酵素に適した緩衝液および基質量は、標準実験室マニュアル、例えば下記に引用されているものに記載されており、それらは販売業者により指定されている。

【0031】通常は37°Cで約1時間のインキュベーション時間を使用するが、条件は、標準的方法、供給者の使用説明書および反応の顛末によって変動し得る。消化後、当業界の熟練者にとっては常用的な公知方法を用いて、反応物は分析され得、フラグメントはアガロースまたはポリアクリルアミドゲルによる電気泳動により精製され得る。

【0032】「遺伝エレメント」は、一般にポリペプチドをコードする領域または宿主細胞におけるポリペプチドの発現に重要な役割または翻訳または他のプロセスを調節する領域を含むポリヌクレオチド、またはポリペプチドをコードする領域およびそこに機能し得るように連結された発現調節領域の両方を含むポリヌクレオチドを包含する。

【0033】遺伝エレメントは、エピソーム成分として、すなわち宿主細胞ゲノムとは物理的に独立した分子として複製するベクター内に含まれ得る。それらはプラスミド内に含まれ得る。遺伝エレメントはまた、それらの自然の状態ではなく、特に、例えば宿主細胞への単離、クローニングおよび導入といった操作が加えられた

後の精製DNA形態またはベクターで宿主細胞ゲノム内にも含まれ得る。

【0034】「宿主細胞」は、外生ポリヌクレオチド配列により形質転換、トランスフェクション、感染またはエントリーされた細胞、または外生ポリヌクレオチド配列による形質転換、感染、トランスフェクションまたはエントリーを受け入れ得る細胞である。

【0035】当業界で知られている「同一性」または「類似性」は、配列比較により決定される2つのポリペ

- 10 プチド配列または2つのポリヌクレオチド配列間の関係である。当業界では、同一性はまた、2つのポリペプチドまたは2つのポリヌクレオチド配列間の配列関連性的程度を意味することもあり、それは上記配列の2つのストリング間の対合により決定される。同一性および類似性は両方とも容易に計算され得る（「コンピューター・モレキュラー・バイオロジー」（Computational Molecular Biology）、レスク、A.M. 編、オクスフォード・ユニヴァーシティ・プレス、ニューヨーク、1988、「バイオコンピューティング：インフォーマティックス・アンド・ゲノム・プロジェクト」（Bioinformatics: Informatics and Genome Projects）、スミス、D.W. 編、アカデミック・プレス、ニューヨーク、1993、「コンピューター・アナリシス・オブ・シークウェンス・データ」（Computer Analysis of Sequence Data）、パートI、グリフィン、A.M. およびグリフィン、H.G. 編、フマーナ・プレス、ニュージャージー、1994、「シークウェンス・アナリシス・イン・モレキュラー・バイオロジー」（Sequence Analysis in Molecular Biology）、フォン・ヘインジェ、G.、アカデミック・プレス、1987、および「シークウェンス・アナリシス・プライマー」（Sequence Analysis Primer）、グリブスコフ、M. およびデヴェリュー、J. 編、M.ストックトン・プレス、ニューヨーク、1991）。2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列間の同一性および類似性については若干の測定方法が存在し、両語とも当技術分野の熟練者にはよく知られている（「シークウェンス・アナリシス・イン・モレキュラー・バイオロジー」（Sequence Analysis in Molecular Biology）、フォン・ヘインジェ、G.、アカデミック・プレス、1987、「シークウェンス・アナリシス・プライマー」（Sequence Analysis Primer）、グリブスコフ、M. およびデヴェリュー、J. 編、M.ストックトン・プレス、ニューヨーク、1991、およびカリーリョ、H. およびリップマン、D.、SIAM「ジャーナル・オブ・アプライド・マス」（J. Applied Math.）、48: 1073 (1988)）。2配列間の同一性または類似性の測定に常用される方法には、カリーリョ、H. およびリップマン、D.、SIAM「ジャーナル・オブ・アプライド・マス」（J. Applied Math.）、48: 1073 (1988) に開示されたものがあるが、それらに限定

されるわけではない。同一性の好ましい決定方法は、試験される2配列間に最大の対合を与えるように設計される。同一性および類似性の決定方法は、コンピュータープログラムで体系化されている。2配列間の同一性および類似性を測定する好ましいコンピュータープログラム方法には、GCGプログラムパッケージ(デヴェリュー、J.ら、(1984)「ヌクレオティック・アシズ・リサーチ」(Nucleic Acids Research)12(1):387)、BLASTP、BLASTNおよびFASTA(アチュール、S.F.ら、(1990)「ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー」(J.Molec.Bio.), 215:403)があるが、これらに限定されるわけではない。

【0036】「単離されている」とは、その自然のままの状態から「人工的に」改変された、すなわち、天然に存在するならば、それがその本来の環境から変えられたかまたは移伝されたか、またはその両方であることを意味する。

【0037】例えば、天然に見いだされるポリヌクレオチドまたは自然のままの状態で生活有機体に自然に存在するポリペプチドは「単離されて」はないが、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドでも、その自然のままの状態の共存体から分離されれば、この語が本明細書で使用されているところの「単離されている」ということになる。例えば、ポリヌクレオチドに関して述べると、「単離されている」の語は、それが本来見いだされる染色体および細胞から分離されていることを意味する。

【0038】単離の一部としてまたは単離後、前記ポリヌクレオチドは、例えば宿主における突然変異誘発、融合タンパク質の形成、および増殖または発現を目的として他のポリヌクレオチド、例えばDNAに結合にされ得る。単離されたポリヌクレオチドは、単独または他のポリヌクレオチド、例えばベクターに結合されて、培養または陰体生物における宿主細胞中に導入され得る。培養または陰体生物における宿主細胞中へ導入される場合、前記DNAは、それらが自然に見いだされる形態または環境にはないことから、前記の語が本明細書で使用されているところの、単離されていることになる。同様に、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、例えば細胞中へポリヌクレオチドまたはポリペプチドを導入するための組成物、例えば培地製剤、溶液、化学または酵素反応用の組成物または溶液に見いだされ得、例えばそれらは天然にみられる組成物ではなく、そこには単離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドが残存していることから、この場合この語は本明細書で使用されている前記した用語の意味の範囲内に含まれる。

【0039】「ライゲーション」は、2個またはそれ以上のポリヌクレオチド間でリン酸ジエステル結合を形成するプロセスを指し、2本鎖DNAであることが最も多

い。ライゲーション技術は当業界では周知であり、ライゲーションプロトコルは標準実験室マニュアルおよび参考文献、例えばサムブルックら、「モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリ・マニュアル」(MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL)、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク(1989)およびマニアチスら、146頁(後記で引用されている)に記載されている。

10 【0040】「オリゴヌクレオチド(複数も可)」は、比較的短いポリヌクレオチドを指す。この語は、1本鎖デオキシリボヌクレオチドを指すことが多いが、特に1本または2本鎖リボヌクレオチド、RNA:DNAハイブリッドおよび2本鎖DNAを指すこともあり得る。

【0041】オリゴヌクレオチド、例えば1本鎖DNAアロープオリゴヌクレオチドは、化学的方法、例えば自動式オリゴヌクレオチド合成装置で行われる方法により合成されることが多い。しかしながら、オリゴヌクレオチドは、インビトロ組換えDNA—伝達技術および細胞20 および生物体におけるDNAの発現を含む様々な他の方法により製造され得る。

【0042】最初、化学合成DNAは、典型的には5' 磷酸なしで得られる。前記したオリゴヌクレオチドの5' 末端は、一般に組換えDNA分子の形成に使用されるDNAリガーゼを用いるライゲーション反応によるリン酸ジエステル結合形成用の基質ではない。前記のオリゴヌクレオチドのライゲーションが望ましい場合、標準技術、例えばキナーゼおよびATPを用いる技術により付加され得る。

30 【0043】化学合成オリゴヌクレオチドの3' 末端は、一般に遊離ヒドロキシル基を有し、リガーゼ、例えばT4 DNAリガーゼの存在下で、別のポリヌクレオチド、例えば別のオリゴヌクレオチドの5' リン酸とリン酸ジエステル結合を容易に形成する。よく知られているように、この反応は、所望ならば、ライゲーション前に他のポリヌクレオチド(複数も可)の5' リン酸を除去することにより選択的に阻止され得る。

【0044】「プラスミド」は、一般に、当業者が使いなれた標準的な命名操作に従い、本明細書では、小文字pを前置し、および/またはつづいて大文字および/または数字で示す。

【0045】本明細書に開示されている出発プラスミドは、市販され、自由原則で公的に入手可能であるか、または公知の公開された方法を常用的に適用することにより利用可能なプラスミドから構築され得る。本発明に従い使用され得る多くのプラスミドおよび他のクローニングおよび発現ベクターは、よく知られており、当業者に容易に利用され得る。さらに、当業者であれば、本発明での使用に適したかなり多數の他のプラスミドでも容易に構築し得る。本発明における上記プラスミドおよび他50

のペクターの特性、構築および用途は、当業者であれば本明細書から容易に理解できるはずである。

【0046】「ポリヌクレオチド(複数も可)」は、一般にポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを包含し、それらは非修飾RNAもしくはDNAまたは修飾RNAもしくはDNAであり得る。すなわち、例えば、ここで使用されているポリヌクレオチドは、特に、1本および2本鎖DNA、1本および2本鎖領域または1本、2本および3本鎖領域の混合物であるDNA、1本または2本鎖RNA、および1本および2本鎖領域の混合物であるRNA、1本鎖またはより一般的には2本鎖、または3本鎖、または1本および2本鎖領域の混合物であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を包含する。

【0047】加えて、本明細書で使用されているポリヌクレオチドは、RNAまたはDNAまたはRNAおよびDNAの両方を含む3本鎖領域を包含する。前記した領域の鎖は同じ分子または異なる分子に由来し得る。これらの領域は1個またはそれ以上の分子の全てを含み得るが、より一般的には幾つかの分子の一領域のみを含み得る。3重らせん領域の分子の一つは、多くの場合オリゴヌクレオチドである。

【0048】本明細書で使用されている、「ポリヌクレオチド」の語は、1個またはそれ以上の修飾塩基を含む上記のDNAまたはRNAを包含する。すなわち、バックボーンが安定性またはその他の理由で修飾されたDNAまたはRNAも、上記で定義されているところの「ポリヌクレオチド」である。さらに、普通でない塩基、例えばイノシンまたは修飾塩基、例えばトリチル化塩基を含むDNAまたはRNAは、2例しか挙げていないが、ここで使用されているところのポリヌクレオチドである。

【0049】DNAおよびRNAに対しては、当業者に周知の多くの有用な目的に役立つ非常に多様な修飾が加えられているものとする。ここで使用されているポリヌクレオチドの語は、ポリヌクレオチドのそうした化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態、ならびにウイルスおよび特に単純型および複雑型細胞などの細胞に特有のDNAおよびRNAの化学的形態を包含する。

【0050】本明細書で使用されている「ポリペプチド」は、下記のポリペプチド全てを包含する。ポリペプチドの基本的構造はよく知られており、当技術分野における無数の教科書および他の出版物に既に記載されている。この明細書において、この語は、ペプチド結合により直鎖で互いに結合された2個またはそれ以上のアミノ酸を含むペプチドまたはタンパク質を包含するものとして使用されている。ここで使用されているとおり、この語は、一般に当業界で例えばペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとして呼ばれてもいる短鎖、並びに一般に当業界でタンパク質として呼ばれ、その多くのタイ

アが存在している長鎖の両方を包含する。

【0051】ポリペプチドは、20天然アミノ酸として一般に称される20アミノ酸以外のアミノ酸を含むことが多く、末端アミノ酸を含む多くのアミノ酸は、所定のポリペプチドにおいて、自然プロセス、例えばプロセッシングおよび他の翻訳後修飾、並びに当業界で公知の化学的修飾技術により修飾され得るものとする。ポリペプチドから本來見いだされる一般的修飾でさえ、多すぎるためにここで余すところ無く列挙することはできないが、それらは基本的なテキストおよび詳細な研究論文並びに多量の研究文献に詳述されており、当業者にはよく知られている。

【0052】本発明ポリペプチドに存在し得る既知修飾には、実例を少し挙げると、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホジルイノシトールの共有結合、架橋、閉環、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、

20 シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、よう案化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、ブレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、転移RNA仲介によるタンパク質へのアミノ酸付加、例えばアルギニル化、およびユビキチン化がある。

【0053】前記の修飾は、当業者には熟知されており、科学文献に非常に詳細に記載されている。幾つかの特に一般的な修飾、例えばグリコシル化、脂質結合、硫酸化、グルタミン酸残基のガンマカルボキシル化、ヒドロキシル化およびADP-リボシル化については、ほとんどの基本的なテキスト、例えば「プロテインズ-ストラクチャー・アンド・モレキュラー・プロパティーズ」(PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES)、第2版、T.E. クレイトン、W.H. フリーマン・アンド・カンパニー、ニューヨーク(1993)に記載されている。このテーマに関する多くの詳細な論評が入手可能であり、例えばウォールド、F.による「ポストトランスレーションナル・コバレント・モディフィケーション・オブ・プロテインズ」(POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS)中、「翻訳後タンパク質修飾：展望および予想」、1-12頁、B.C. ジョンソン編、アカデミック・プレス、ニューヨーク(1983)、ザイフラーら(1990)、「メソッズ・イン・エンザイモロジー」(Meth. Enzymol.) 182: 626-646およびラッタンら、(1992) Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging、

30 「アンルズ・オブ・ザ・ニューヨーク・アカデミー・オブ・サイエンス」(Ann. N.Y. Acad. Sci.) 663: 48-50 62がある。

【0054】公知のことであり、また上記のとおり、ポリペプチドは必ずしも完全に線状とは限らないものとする。例えば、ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝状であり得、一般的に自然プロセッシング事象および自然では見られない人為的事象を含む翻訳後事象の結果として、分枝部分を伴う場合も伴わない場合も環状であり得る。環状、分枝状および分枝環状ポリペプチドは、非翻訳自然プロセスおよび完全な合成方法によっても合成され得る。

【0055】ペプチドバックボーン、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含む、ポリペプチドのあらゆる場所で修飾は行われ得る。事実、共有結合修飾による、ポリペプチドでのアミノまたはカルボキシル基または両方の遮断は、天然および合成ポリペプチドに共通しており、上記修飾は本発明ポリペプチドにも存在し得る。例えば、タンパク質分解プロセッシングの前に、エシェリヒア・コリまたは他の細胞で生成されたポリペプチドのアミノ末端残基は、ほぼ必ずN-ホルミルメチオニンである。ペプチドの翻訳後修飾中、NH<sub>2</sub>-末端のメチオニン残基は欠失され得る。従って、本発明は、本発明タンパク質のメチオニン含有およびメチオニン不含有アミノ末端変異体の使用を意図したものである。

【0056】ポリペプチドに見られる修飾は、それがいかにして生成されるかの相関関係であることが多い。例えば、宿主においてクローニング遺伝子を発現させることにより生成されたポリペプチドの場合、大きな部分における修飾の性質および範囲は、宿主細胞翻訳後修飾能力およびポリペプチドアミノ酸配列に存在する修飾シグナルにより決定される。例えば、よく知られているところでは、グリコシル化は、多くの場合、細菌宿主、例えばエシェリヒア・コリ(E. coli)では行わぬ。従って、グリコシル化が所望される場合、ポリペプチドは糖鎖形成性宿主、一般に真核細胞で発現されるべきである。

【0057】同じタイプの修飾は、所定のポリペプチドにおける幾つかの部位で同じかまたは異なる程度に存在し得るものとする。また、所定のポリペプチドは多くのタイプの修飾を含み得る。一般に、ここで使用されているところでは、ポリペプチドの語は、上記の修飾を全て、特に宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現させることにより合成されたポリペプチドに存在するものを包含する。

【0058】「形質転換」は、外生DNAが細胞膜内側に導入されたとき、細胞が上記外生DNAにより形質転換されるプロセスである。外生DNAは、細胞のゲノムを構成する染色体DNA中に組み込まれている（共有結合されている）こともあれば、組み込まれていないこともあり得る。例えば原核細胞および酵母では、外生DNAは、エピソーム成分、例えばプラスミドで維持され得る。真核細胞に関して述べると、安定して形質転換ま

はトランスフェクションされた細胞は、外生DNAが染色体中に組み込まれることにより、それが染色体複製を通して娘細胞により受け継がれているものであることが多い。この安定性は、真核細胞が、外生DNAを含む娘細胞の集団からなるセルラインまたはクローンを確立する能力により証明される。

【0059】ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの「変種（複数も可）」は、この語がここで使用されているところによると、それぞれレファレンス（標準）ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。この意味での変種は、非常に詳細に下記および本明細書の他の場所に記載されている。

【0060】(1)別のレファレンスポリヌクレオチドとはヌクレオチド配列が異なるポリヌクレオチド。一般に、差異は限られているため、レファレンスおよび変種のヌクレオチド配列は全体的に密接に類似しており、多くの領域では同一である。

【0061】後記に示されているとおり、変種のヌクレオチド配列の変化はサイレントであり得る。すなわち、それらはポリヌクレオチドによりコードされたアミノ酸を改変し得ない。改変がこのタイプのサイレント変化に限られている場合、変種は、レファレンスと同じアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードする。また下記に示されているとおり、変種のヌクレオチド配列が変化すると、レファレンスポリペプチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列が改変され得る。このヌクレオチドの変化の結果、下記で検討されている、レファレンス配列によりコードされるポリペプチドにおいてアミノ酸置換、付加、欠失、融合および先端切除が行われ得る。

【0062】(2)別のレファレンスポリペプチドとはアミノ酸配列が異なるポリペプチド。一般に、差異は限られているため、レファレンスおよび変種のヌクレオチド配列は全体的に密接に類似しており、多くの領域では同一である。変種およびレファレンスポリペプチドは、アミノ酸配列に1つまたはそれ以上の置換、付加、欠失、融合および先端切除が存在する点で異なり得、それらはいかなる組み合わせでも存在し得る。

【0063】

【発明の実施の形態】本発明は、特に、後記で詳述されているところの新規FAB-Iポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関するものである。特に、本発明は、マイコバクテリア( *M. h A* )、ヘモフィルス・インフルエンザ(*H. influenzae*)、ブロッサカ・ナップス(*Brassica napus*)（菜種）エノイル-ACPレダクターゼからのF a b I 酶素、およびエシェリヒア・コリ(*E. coli*) F a b I タンパク質とのアミノ酸配列相同性という点で関連性がある、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)の新規FAB-I遺伝子のポリペプチドお

およびポリヌクレオチドに関するものである。

【0064】本発明は、特に図2〔配列番号1〕および図1〔配列番号2〕にそれぞれ示されたヌクレオチドおよびアミノ酸配列を有するFAB I、およびNCIMB寄託番号40771におけるFAB Iヌクレオチド配列およびそこからコードされたアミノ酸配列(本明細書中、「寄託されたクローン」または「寄託されたクローンのDNA」と称する)に関するものである。図1〔配列番号2〕および図2〔配列番号1〕に示されたヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、寄託されたクローンのFAB I DNAを配列決定することにより得られたものとする。このため、寄託されたクローンの配列は、それ(およびそれがコードする配列)および図1〔配列番号2〕または図2〔配列番号1〕の配列間に不一致があればそれにに関して制御性を示す。

#### 【0065】ポリヌクレオチド

本発明の一態様によると、図1〔配列番号2〕の誘導されたアミノ酸配列を有するFAB Iポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0066】ここに提供された情報、例えば図2〔配列番号1〕に示されたポリヌクレオチド配列を用いると、FAB Iポリペプチドをコードする本発明ポリヌクレオチドは、標準的クローニングおよびスクリーニング方法、例えば出発材料としてスタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)WC UH 29細胞を用いて細菌からゲノムDNAをクローニングする方法を用いることにより得られる。本発明の実例となる、図2に示されたポリヌクレオチドは、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)WC UH 29から誘導されたゲノムDNAライブラリーで発見された。

【0067】寄託されたクローンにおいてFAB IをコードするゲノムDNAの配列決定をした結果が示すところによると、本発明のFAB Iは、エノイル-ACPレダクターゼ群の他のタンパク質と構造的に関連性がある。こうして得られたDNA配列は図2〔配列番号1〕に示されている。それは、推定分子量が約27.99 kDaである約256アミノ酸残基のタンパク質をコードする読み取り枠を含む。このタンパク質は、既知タンパク質の中でもエシェリヒア・コリ(*E.coli*)Fab Iタンパク質と最大の相同性を呈する。図1〔配列番号2〕のFAB Iは、エシェリヒア・コリ(*E.coli*)エノイル(ACP)レダクターゼ(Fab I)、スイスアロット受け入れ番号P29132のアミノ酸配列とは約4.4%の同一性および約6.4%の類似性を有する。

【0068】本発明のポリヌクレオチドは、RNA、例えばmRNAの形態またはDNA、例えば、クローニングにより得られるかまたは化学合成技術によりまたはその組み合わせにより生成されるcDNAおよびゲノムDNAの形態であり得る。DNAは、2本鎖または1本鎖であり得る。1本鎖DNAは、センス鎖としても知られ

ているコーティング鎖であり得るか、またはそれはアンセンス鎖とも呼ばれる非コーティング鎖であり得る。

【0069】ポリペプチドをコードする暗号化配列は、図2〔配列番号1〕に示されたポリヌクレオチドのコーティング配列と同一であり得る。それはまた、異なる配列をもつポリヌクレオチドであり得、追伝コードの重複性(縮重)の結果として、図1〔配列番号2〕のDNAのポリペプチドをコードする。

- 【0070】図1〔配列番号2〕のポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドには、単独での成熟ポリペプチドの暗号化配列、成熟ポリペプチドの暗号化配列および追加の暗号化配列、例えば先導または分泌配列、例えばプレまたはプロまたはプレプロタンパク質配列をコードする上記配列、前述の追加暗号化配列を伴う場合も伴わない場合もあるが、例えれば非暗号化5'および3'配列、例えれば転写(例えば終結シグナルを含む)、リボソーム結合、mRNA安定性成分においてある一定の役割を演じる転写非翻訳配列を含む(ただし、これらに限定されるわけではない)追加の非暗号化配列、および追加アミノ酸、例えれば追加的機能性を提供する追加アミノ酸をコードする追加の暗号化配列と共に存する成熟ポリペプチドの暗号化配列があり得るが、これらに限定されるわけではない。すなわち、例えればポリペプチドは、マーカー配列、例えればペプチドに融合され得、それによって融合ポリペプチドの精製は容易になる。本発明のこの態様のある具体例では、マーカー配列は検討されているヘキサ-ヒスチジンであり、これは他の標識方法、ペプチド、例えば特にpQEベクター(キアゲン、インコーポレイテッド)で提供された標識を含むべきであり、それらの多くは市販されている。例えれば、ゲンツラ、(1989)「プロセーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユニティッド・ステーツ・オブ・アメリカ」(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA)86:821-824に記載されているとおり、ヘキサ-ヒスチジンを用いると、融合タンパク質の好都合な精製が可能となる。HA標識はまた、融合タンパク質生成に使用され得、例えればウィルソンら、(1984)「セル」(Cell)37:767により報告されたインフルエンザ血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに相当する。
- 【0071】前記したことによると、本明細書で使用されている「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」の語は、本発明ポリペプチド、特に図1〔配列番号2〕に示されたアミノ酸配列を有するスタフィロコッカスFAB Iをコードする配列を含むポリヌクレオチドを包含する。この語は、ポリペプチドをコードする单一連続領域または非連続領域(例えば組み込まれたファージ、挿入配列、組換えまたは校正により中断されている)を、同じく暗号化および/または非暗号化配列を含み得る追加領域と共存した形で含むポリヌクレオチドを

包含する。

【0072】さらに本発明は、図1【配列番号2】の誘導されたアミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメント、類似体および誘導体をコードする上記ポリヌクレオチドの変種に関するものである。ポリヌクレオチドの変種は、天然変種、例えば天然に存在する対立遺伝子変種であり得、またはそれは天然に存在することが知られていない変種であり得る。ポリヌクレオチドの前記した非天然変種は、ポリヌクレオチド、細胞または生物に適用されるものを含む突然変異誘発技術により生成され得る。

【0073】この点に関し変種の中には、ヌクレオチドの置換、欠失または付加により前述のポリヌクレオチドとは異なる変種がある。置換、欠失または付加には、1個またはそれ以上のヌクレオチドが関与し得る。変種は、暗号化または非暗号化領域またはその両方で改変され得る。暗号化領域における改変により、保存または非保存アミノ酸置換、欠失または付加が行われ得る。

【0074】この点に関し本発明の特に好ましい態様の中には、図1【配列番号2】に示されたFAB Iのアミノ酸配列を有するポリペプチド、その変種、類似体、誘導体およびフラグメント、および変種、類似体および誘導体のフラグメントをコードするポリヌクレオチドがある。

【0075】さらにこの点に関し特に好ましいのは、FAB I変種、類似体、誘導体およびフラグメント、およびフラグメントの変種、類似体および誘導体をコードするポリヌクレオチドであり、これらは図1【配列番号2】のFAB Iポリペプチドのアミノ酸配列を有するが、数個、少数個、5～10、1～5、1～3、2、1または0個のアミノ酸残基が関与する置換、欠失または付加が組み合わされて存在する。これらの中で特に好ましいのは、FAB Iの特性および活性を改変しないサイレント置換、付加または欠失である。またこの点に関し特に好ましいのは、同類置換である。最高に好ましいのは、置換を伴わない図1【配列番号2】のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

【0076】本発明のさらに好ましい具体例は、図1【配列番号2】に示されたアミノ酸配列を有するFAB Iポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも70%同一のポリヌクレオチド、および上記ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドである。別法として、最高に好ましいのは、寄託されたクローニングのスタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)DNAによりコードされるFAB Iポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも80%同一の領域を含むポリヌクレオチドおよびそれに相補的であるかまたは図2【配列番号1】に示されたポリヌクレオチドである。この点について、上記のものと少なくとも9

0%同一のポリペプチドが特に好ましく、これらの特に好ましいポリヌクレオチドの中で、少なくとも95%の場合が特に好ましい。さらに、少なくとも95%のものの中でも少なくとも97%の場合が非常に好ましく、これらの中でも少なくとも98%および少なくとも99%の場合が特に好ましく、さらには少なくとも99%の場合がより好ましい。

【0077】さらに、この点に関し特に好ましい具体例は、図2【配列番号1】のDNAによりコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物機能または活性を保持するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

【0078】さらに、本発明は、上記配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドに関するものである。この点について、本発明は、特に、ストリンジェントな条件下で上記ポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドに関するものである。ここで使用されている、「ストリンジェントな条件」の語は、配列間に少なくとも95%および好ましくは少なくとも97%の相同性がある場合にのみハイブリダイゼーションが行われることを意味する。

【0079】本発明のポリヌクレオチド検定に関してここでさらに検討されているところによると、例えば上記で検討されている本発明ポリヌクレオチドを、RNA、cDNAおよびゲノムDNA用のハイブリダイゼーションプローブとして使用することにより、FAB Iをコードする完全長cDNAおよびゲノムクローンが単離され、FAB I遺伝子と高度配列類似性を有する他の遺伝子のcDNAおよびゲノムクローンが単離され得る。上記プローブは一般に少なくとも15塩基を有する。好ましくは、上記プローブは、少なくとも30塩基を有し、少なくとも50塩基を有し得る。特に好ましいプローブは、少なくとも30塩基を有し、50またはそれ未満の塩基を有する。

【0080】例えば、FAB I遺伝子の暗号化領域は、既知DNA配列を用いてオリゴヌクレオチドプローブを合成させるスクリーニングにより単離され得る。次いで、本発明遺伝子の配列と相補的な配列を有する標識オリゴヌクレオチドを用いることにより、cDNA、ゲノムDNAまたはmRNAのライブラリーがスクリーニングされ、ライブラリーのどの成分にプローブがハイブリダイズするかが決定される。

【0081】本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、特に本明細書でポリヌクレオチド検定に関してさらに検討されているところによると、疾患、特にヒトの疾患に関する治療および診断の発見用研究試薬および材料として使用され得る。配列番号1の配列から誘導された配列番号3および4を含むオリゴヌクレオチドである本発明ポリヌクレオチドを、本明細書に記載した方法におけるPCRプライマーとして使用することにより、

21

全体または部分的にここで同定されたスタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)遺伝子が感染組織で転写されているか否かが決定され得る。また本発明は、前記の配列がまた、病原体が獲得した感染の段階および感染のタイプの診断における有用性を有し得ることを示している。

【0082】ポリヌクレオチドは、成熟タンパク質+追加アミノまたはカルボキシ末端アミノ酸、または成熟ホリペアチドにとって内部（例えば、成熟形態が複数のポリペアチド鎖を有するとき）アミノ酸であるポリペアチドをコードし得る。上記配列は、特に、前駆体から成熟形態へのタンパク質のプロセスにおいてある役割を演じ得、タンパク質輸送を可能にし得、タンパク質半減期を延長または短縮し得るか、または検定または製造のためのタンパク質の操作を容易にし得る。インビボでは一般的なことであるが、追加アミノ酸は、細胞酵素により成熟タンパク質からプロセッシングされ得る。

【0083】1つまたはそれ以上のプロ配列に融合されたポリペアチドの成熟形態を有する前駆体タンパク質は、ポリペアチドの不活性形態であり得る。プロ配列が除去されると、前記不活性前駆体は一般に活性化される。プロ配列の一部または全部が活性化前に除去され得る。一般に、前記前駆体はプロタンパク質と呼ばれる。

【0084】要するに、本発明のポリヌクレオチドは、成熟タンパク質、成熟タンパク質+先導配列（アレタンパク質と称され得る）、アレタンパク質の先導配列ではない1つまたはそれ以上のプロ配列を有する成熟タンパク質の前駆体、または一般にポリペアチドの活性および成熟形態を生成するプロセッシング段階中に除去される、先導配列および1つまたはそれ以上のプロ配列を有する、プロタンパク質にとって前駆体であるアレプロタンパク質をコードし得る。

#### 【0085】寄託材料

スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)WCUH 29株を含む寄託物は、1995年9月1日に23セント・マチャー・ドライブ、アバディーンAB 2 1 RY、スコットランドのナショナル・コレクションズ・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア・リミテッド(NCIMB)に寄託され、NCIMB受託番号40771が付与された。FAB Iクローン寄託物を、本明細書中、「寄託されたクローン」または「寄託されたクローンのDNA」という。

【0086】寄託された材料は、完全長FAB I DNAを含む株であり、寄託時「NCIMB 40771」と名付けられた。寄託された材料に含まれるポリヌクレオチドの配列およびそれによりコードされるポリペアチドのアミノ酸配列は、ここでの配列の記載内容と相反する事象において制御性を示す。

【0087】この寄託は、特許手続き上の微生物寄託の国際承認に関するブダペスト条約の条件下で為された。

22

特許が発行されると何らの制限または条件もなく、最終的に株は分譲される。寄託物は当業者の便宜のためにのみ提供され、35 U.S.C. 112条の下で要求されるような、寄託が実施可能要件であることを承認するものではない。寄託材料の製造、使用または販売にはライセンスが必要であるが、ここではかかるライセンスは付与されるものではない。

#### 【0088】ポリペアチド

さらに本発明は、図1【配列番号2】の推定アミノ酸配列を有する原核生物FAB Iポリペアチドに関するものである。また本発明は、これらのポリペアチドのフラグメント、類似体および誘導体に関するものである。

「フラグメント」、「誘導体」および「類似体」の語は、図1【配列番号2】のポリペアチドに関する場合、前記ポリペアチドと同じ生物機能または活性を保持しているポリペアチドを意味する。すなわち、類似体は、プロタンパク質部分の開裂により活性化され、活性成熟ホリペアチドを生成し得るプロタンパク質を包含する。

【0089】本発明のポリペアチドは、組換えポリペアチド、天然ポリペアチドまたは合成ポリペアチドであり得る。ある好ましい具体例では、それは組換えポリペアチドである。

【0090】図1【配列番号2】のポリペアチドのフラグメント、誘導体または類似体は、(i) 1個またはそれ以上のアミノ酸残基が保存または非保存アミノ酸残基（好ましくは保存アミノ酸残基）により置換されており、前記置換アミノ酸残基が遺伝コードによりコードされるものであり得る場合もあればまたはあり得ない場合もあるもの、または(ii) 1個またはそれ以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの、または(iii) 成熟ホリペアチドが別の化合物、例えばポリペアチドの半減期を延ばす化合物（例えば、ポリエチレンギリコール）と融合されているもの、または(iv) 追加アミノ酸が成熟ホリペアチド、例えば先導または分泌配列または成熟ホリペアチドの精製に使用される配列またはプロタンパク質配列に融合されているものであり得る。前記フラグメント、誘導体および類似体は、本明細書に示された内容から当業者であれば可能な領域内に含まれるものとする。

【0091】この点に関し本発明の特に好ましい具体例には、図1【配列番号2】に示されたFAB Iのアミノ酸配列を有するポリペアチド、それらの変種、類似体、誘導体およびフラグメント、並びに前記フラグメントの変種、類似体および誘導体がある。別法として、この点に関し本発明の特に好ましい具体例は、FAB Iのアミノ酸配列を有するポリペアチド、それらの変種、類似体、誘導体およびフラグメント、並びに前記フラグメントの変種、類似体および誘導体である。

【0092】好ましい変種には、同類アミノ酸置換によりレファレンスから変化したものがある。前記置換は、

ポリペプチド中の所定アミノ酸を同様の特性をもつ別のアミノ酸により置換したものである。一般的に同類置換として見られるのは、脂肪族アミノ酸A l a、V a l、L e u およびI l e の中の互いの置換、ヒドロキシル残基S e r およびT h r の相互交換、酸性残基A s p およびG l u の交換、アミド残基A s n およびG l n 間の置換、塩基性残基L y s およびA r g の交換並びに芳香族残基P h e 、T y r 間の置換である。

【0093】さらにこの点に関し特に好ましいのは、数個、少數個、5~10、1~5、1~3、2、1または0個のアミノ酸残基が関与する置換、欠失または付加が任意に組み合わされて存在する図1【配列番号2】のF A B I ポリペプチドのアミノ酸配列を有する変種、類似体、誘導体およびフラグメント、並びにフラグメントの変種、類似体および誘導体である。これらの中で特に好ましいのは、サイレント置換、付加および欠失であり、これらはF A B I の特性および活性を改变することはない。また、この点に関し特に好ましいのは、同類置換である。最高に好ましいのは、置換を伴わない図1【配列番号2】のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0094】本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、好ましくは単離形態で提供され、好ましくは等質に精製されている。本発明のポリペプチドは、配列番号2のポリペプチド（特に成熟ポリペプチド）並びに配列番号2のポリペプチドと少なくとも80%の同一性およびさらに好ましくは配列番号2のポリペプチドと少なくとも90%の類似性（さらに好ましくは少なくとも90%の同一性）、さらに好ましくは配列番号2のポリペプチドと少なくとも95%の類似性（より好ましくは少なくとも95%の同一性）を有するポリペプチドを含み、また、前記ポリペプチドの一部分を一般に少なくとも30アミノ酸およびさらに好ましくは少なくとも50アミノ酸を含むポリペプチドの前記部分と共に含む。

【0095】本発明のフラグメントまたは一部分は、ペプチド合成により対応する完全長ポリペプチドを製造するのに使用され得る。従って、フラグメントは、完全長ポリペプチド製造用の中間体として使用され得る。本発明のポリヌクレオチドのフラグメントまたは一部分は、本発明の完全長ポリヌクレオチドの合成に使用され得る。

#### 【0096】フラグメント

また、本発明のこの態様の好ましい具体例には、F A B I のフラグメント、特に図1【配列番号2】に示されたアミノ酸を有するF A B I のフラグメントおよび図1【配列番号2】のF A B I の変種および誘導体のフラグメントを有してなるポリペプチドがある。

【0097】この点に関し、フラグメントは、前述のF A B I ポリペプチドおよびその変種または誘導体のアミノ酸配列の全部ではなく一部と全く同じであるアミノ

酸配列を有するポリペプチドである。

- 【0098】前記フラグメントは、「それ自体で自立している」ものであり得る、すなわち他のアミノ酸またはポリペプチドの一部またはそれらに融合したものではないか、またはそれらは、それらがある部分または領域を形成しているその大きい方のポリペプチド内に含まれ得る。大きい方のポリペプチド内に含まれる場合、ここで検討されているフラグメントは最も好ましくは単一連続領域を形成する。しかしながら、数個のフラグメントは、大きい方の単一ポリペプチド内に含まれ得る。例えば、ある好ましい具体例は、F A B I フラグメントのアミノ末端に融合した異種アレおよびアローポリペプチド領域およびフラグメントのカルボキシル末端に融合した追加領域を有する宿主での発現用に設計された前駆体ポリペプチド内に含まれる本発明F A B I ポリペプチドのフラグメントに関するものである。従って、ここで意図された意味の一面でのフラグメントは、F A B I から誘導された融合ポリペプチドまたは融合タンパク質の一部（複数も可）を指す。
- 【0099】特に好ましいフラグメントは、アミノ酸1~20、21~40、41~60、61~80、81~100、101~120、121~140、141~160、161~180、181~200、201~220、221~240、241~256によりコードされるものおよびその同一範囲内の組み合せを含む。
- 【0100】さらに特に好ましいフラグメントには、例えば他の配列決定された构造的に関連した成分に対して高い相同性を示すものがある。これらには、例えば、約13~約25、約32~約39、約112~約125、約156~約196および約231~約252を含むエシェリヒア・コリf a b I のフラグメントに相同的な領域がある。本発明の特に好ましいフラグメントには、F A B I の先端切除突然変異体がある。先端切除突然変異体は、図1【配列番号2】のアミノ酸配列を有するF A B I ポリペプチドまたはそれらの変種または誘導体を包含するが、ただし、アミノ末端を含む一連の残基（すなわち、連続した領域、一部または部分）またはカルボキシル末端を含む一連の残基の欠失または、二重先端切除突然変異体の場合と同様、一つはアミノ末端を含み、一つはカルボキシル末端を含む残基の2連続領域の欠失は例外である。また、前記に示されたサイズ範囲を有するフラグメントも先端切除フラグメントの好ましい具体例であり、全般的にフラグメントの中でも特に好ましい。宿主細胞、特にスタフィロコッカスにおける本発明ポリペプチドの分解産物もまた、好ましいポリペプチドである。
- 【0101】また、本発明のこの態様で好ましいのは、F A B I の构造的または機能的特性を特徴とするフラグメントである。この点に関して本発明の好ましい具体例には、F A B I のアルファーらせんおよびアルファ

らせん形成領域（「アルファ領域」）、ベータシートおよびベータシート形成領域（「ベータ領域」）、ターンおよびターン形成領域（「ターン領域」）、コイルおよびコイル形成領域（「コイル領域」）、親水性領域、疎水性領域、アルファ両親媒性領域、ベータ両親媒性領域、可変領域、表面形成領域および高抗原指標領域を含むフラグメントがある。

【0102】この点に関して好ましいフラグメントには、相違的特徴、例えば前記に示された特徴を含むFAB Iの領域を含むものがある。この点に関し、残基1～約8、約26～約34、約39～約61、約70～約80、約95～約107、約127～約139、約162～約173および約207～約220により画定される領域は、アルファらせん形成領域を含むと考えられるアミノ酸を特徴とする。さらに、残基約9～約13、約19～約25、約62～約69、約85～約95、約141～約156、約173～約188、約220～約226、約232～約240により画定される領域は、ベータシート領域を含むと考えられる残基を特徴とする。また、残基約80～約85、約108～約112、約120～約125、約178～約183および約198～約203により画定される領域は、ターン領域を含むと考えられる領域を特徴とする。また、残基約80～約85、約105～約110、約120～約125、約138～約143、約145～約153、約175～約180、約187～約192および約240～約245により画定される領域は、コイル領域を含むと考えられるアミノ酸組成を特徴とする。残基約9～約14、約20～約36、約86～約98、約115～約129、約138～約152、約161～約179、約185～約195、約226～約240、約249～約256により画定される領域は、疎水性アミノ酸を特徴とする。さらに、残基約2～約8、約14～約19、約36～約86、約98～約115、約130～約138、約152～約161、約180～約186、約206～約226および約239～約249により画定される領域は、親水性アミノ酸を特徴とする。また、残基約20～約40、約43～約62、約72～約93、約102～約117、約128～約140、約180～約220および約228～約240により画定される領域は、アルファ両親媒性領域を含むと考えられるアミノ酸残基を特徴とし、約1～約10、約27～約50、約60～約72、約97～約110、約158～約191、約208～約220および約240～約252により画定される領域は、ベータ両親媒性領域を含むと考えられるアミノ酸残基を特徴とする。さらに、残基約38～58、約77～約89、約98～約114、約130～約142、約190～約204、約208～約230、および約234～約246により画定される領域は、可変領域を含むと考えられるアミノ酸残基を特徴とする。残基約34～約

62、約98～約112および約206～約222により画定される領域は、表面形成領域を含むと考えられる。さらに、残基約3～約9、約14～約20、約25～約33、約38～約60、約65～約88、約98～約114、約120～約124、約130～約140、約178～約185、約195～約228および約236～約247により画定される領域は、高抗原性領域を含むと考えられる。前記領域は、前記で検討されているとおり、大きい方のポリペプチド内に含まれ得るかまたはそれら自体本発明の好ましいフラグメントであり得る。このパラグラフで使用されている「約」の語は、全般的にフラグメントに関して前記で示された意味を有するものとする。

【0103】さらに好ましい領域は、FAB Iの活性を伝達するものである。この点に関して最高に好ましいのは、FAB Iの化学的、生物学的または他の活性を有するフラグメント、例えば類似活性または改善された活性をもつか、または望ましくない活性を低下させたものである。この点に関して非常に好ましいのは、間連ポリペプチド、例えばエシェリヒア・コリ(E.coli)エノイル(ACP)レダクターゼ、Fab Iを含む、図1【配列番号2】に示された間連ポリペプチドの活性領域に対して配列、または位置または両配列が相同的である領域を含むフラグメントである。これらの点に関して特に好ましいフラグメントには、前記で検討されている先端切除突然変異体がある。さらに好ましいポリヌクレオチドフラグメントは、動物、特にひとにおいて抗原性または免疫原性を示すものである。

【0104】本発明はまた、特に、前述のフラグメントをコードするポリヌクレオチド、フラグメントをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチド、特にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするもの、およびフラグメントをコードするポリヌクレオチドを増幅するためのポリヌクレオチド、例えばPCRプライマーに関するものとする。この点に関して、好ましいポリヌクレオチドは、前記で検討されているとおり、好ましいフラグメントに対応するものである。

【0105】ベクター、宿主細胞、発現  
本発明はまた、本発明のポリヌクレオチド（複数も可）  
40 を含むベクター、本発明ベクターによる遺伝子操作が行われる宿主細胞および組換え技術による本発明ポリペプチドの製造に関するものである。

【0106】宿主細胞では、遺伝子工学技術によりポリヌクレオチドが組み込まれ、本発明ポリペプチドが発現され得る。例えば、ポリヌクレオチドは、感染、形質導入、トランسفェクション、トランスペクションおよび形質転換の公知技術を用いて宿主細胞中に導入され得る。ポリヌクレオチドは、単独または他のポリヌクレオチドと共に導入され得る。それらの他のポリヌクレオチドは、独立して導入、同時導入または本発明ポリヌクレ

オチドに結合されて導入され得る。

【0107】すなわち例えば、ポリヌクレオチドは、宿主で増殖させるため選択可能なマーカーを含むベクターに結合され得る。ベクター構築物は、前述の技術により宿主細胞中に導入され得る。一般に、プラスミドベクターは、沈殿物、例えばリン酸カルシウム沈殿物中または荷電脂質との複合体中におけるDNAとして導入される。また電気穿孔を用いることにより、ポリヌクレオチドが宿主中に導入され得る。ベクターがウイルスである場合、それはインピトロで封入されるかまたは封入用細胞中に導入され得、封入されたウイルスは細胞中に形質導入され得る。本発明のこの態様によるポリヌクレオチド製造および細胞へのポリヌクレオチド導入に適した多様な技術は公知であり、当業者には常用的である。前記技術は、前記で引用されたサムブルックらにより詳細に再検討されており、これはこれらの技術について詳述している多くの実験用マニュアルの実例である。本発明のこの態様によると、ベクターは、例えばプラスミドベクター、1本または2本鎖ファージベクター、1本または2本鎖RNAまたはDNAウイルスベクターであり得る。前記ベクターは、細胞へのDNAおよびRNA導入に関する公知技術により、ポリヌクレオチド、好ましくはDNAとして細胞中に導入され得る。また、ファージおよびウイルスベクターの場合、ベクターは、感染および形質導入に関する公知技術により封入または包膜ウイルスとして細胞中へ導入され得、好ましくは導入される。ウイルスベクターは、複製適格または複製能欠損であり得る。後者の場合、ウイルス増殖は一般に相補性宿主細胞でのみ行われる。

【0108】ある点に関し、ベクターの中で好ましいのは、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現に用いられるものである。一般に、前記ベクターは、発現されるポリヌクレオチドに機能し得るように結合された宿主での発現に有効なシス作用制御領域を含む。適当なトランス作用因子は、宿主への導入時に宿主により供給されるか、相補性ベクターにより供給されるかまたはベクター自体により供給される。

【0109】この点に関しある好ましい具体例では、ベクターにより特異発現が行われる。この特異発現は、誘導性発現またはあるタイプの細胞のみでの発現または誘導可能かつ細胞特異的なものであり得る。誘導性ベクターの中特に好ましいのは、操作を容易にする環境因子、例えば温度および栄養素添加剤により発現に関して誘導され得るベクターである。原核生物および真核生物宿主で使用される構成および誘導発現ベクターを含む、本発明のこの態様に適した多様なベクターは、公知であり、当業者により常用的に使用される。

【0110】遺伝子操作が加えられた宿主細胞は、特にプロモーターを活性化し、形質転換体を選択し、または遺伝子を増幅するため適当に修飾され得る慣用的栄養培

地で培養され得る。発現用に選択された宿主細胞で以前に使用された培養条件、例えば温度、pHなどは、当業界熟練者には明らかなどおり、一般に本発明ポリペプチドの発現に適したものである。

【0111】極めて多様な発現ベクターが、本発明ポリペプチドの発現に使用され得る。前記ベクターには、特に、染色体、エビソームおよびウイルス誘導ベクター、例えば細菌性プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エビソーム、挿入成分、酵母染色体成分、ウイルス、例えばバクロウイルス、バーバウイルス、例えばSV40、ワクニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスから誘導されたベクター、およびそれらの組み合わせから誘導されたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージ遺伝子成分、例えばコスマミドおよびファージミドから誘導されたものがあり、全て本発明のこの態様による発現に使用され得る。一般に、ポリヌクレオチドを維持、増殖または発現させ、宿主でポリペプチドを発現させるのに適したベクターであれば全て、この点に関する発現に使用され得る。

【0112】適当なDNA配列は、多様な公知で常用の技術のいずれかによりベクター中へ挿入され得る。一般に、発現させるDNA配列は、1種またはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼでDNA配列および発現ベクターを開裂し、次いでT4 DNAリガーゼを用いて制限フラグメントと一緒に結合することにより発現ベクターに結合される。この目的に使用され得る制限およびライゲーション方法は、当業者には熟知されており常用的なものである。この点に関して、および代替技術を用いて発現ベクターを構築するのに適当な方法は、同じく熟練者には熟知され常用的なものであるが、サムブルックら、(1989)「モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリ・マニュアル」(MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL)、第2版(コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・アレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク)で非常に詳細に示されている。

【0113】発現ベクターにおけるDNA配列は、例えばmRNA転写を指令するプロモーターを含む、適当な発現制御配列(複数も可)に機能し得るように結合される。前記プロモーターの代表的なものとしては、公知プロモーターの名前を少しばかり挙げると、ファージ・ラムダPLプロモーター、エシェリヒア・コリ lac, t<sub>RP</sub> および tac プロモーター、SV40初期および後記プロモーターおよびレトロウイルスLTRのプロモーターがある。挙げられていないプロモーターでも本発明のこの態様での使用に適したものが多く知られており、こここの検討事項および実例により説明された方法で熟練者により容易に使用され得るものとする。

【0114】一般に、発現構築物は、転写開始および終結部位、および転写領域には翻訳用のリボソーム結合部

位を含む。構築物により発現される成熟転写物の暗号化部分は、翻訳されるポリペプチドの端部に適当に位置した開始および終止コドンに翻訳開始AUGを含む。

【0115】さらに、構築物は、発現を調節および発生させる制御領域を含み得る。一般に、多くの普通に実践されている方法によると、前記領域は、特に、転写、例えば転写因子、リブレッサー結合部位および終結を制御することにより機能する。

【0116】増殖および発現用ベクターは、一般に選択可能なマーカーを含む。前記マーカーはまた増幅にも適当であり得るか、またはベクターはこの目的のために追加マーカーを含み得る。この点に因し、発現ベクターは、好ましくは1種またはそれ以上の選択可能なマーカー遺伝子を含み、形質転換された宿主細胞を選択するための表現型特性が提供される。好ましいマーカーには、真核生物細胞培養の場合ジヒドロ葉酸レダクターゼおよびネオマイシン耐性、およびエシェリヒア・コリおよび他の原核生物培養の場合テトラサイクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子がある。

【0117】本明細書の他の場所に記載された適当なDNA配列を含むベクター、並びに適当なプロモーター、および他の適当な制御配列は、所望のポリペプチドの宿主での発現に適した多様な公知技術を用いて適当な宿主に導入され得る。適当な宿主の代表例には、細菌細胞、例えばストレアプロコッカス、スタフィロコッカス、エシェリヒア・コリ、ストレアトマイシスおよびサルモネラ・ティフィムリウム細胞、真菌細胞、例えば酵母細胞およびアスペルギルス細胞、昆虫細胞、例えばドロソフィラS2およびスピードアテラSf9細胞、動物細胞、例えばCHO、COSおよびボウウェズメラノーマ細胞、および植物細胞がある。非常に多様な発現構築物に関する宿主は公知であり、熟練者であれば本明細書に従い本発明のこの態様によるポリペプチド発現用宿主を容易に選択することができるはずである。

【0118】さらに詳細には、本発明はまた、1つまたはそれ以上の前記配列を含む組換え構築物、例えば発現構築物を包含する。これらの構築物は、本発明の前記配列が挿入されたベクター、例えばプラスミドまたはウイルス性ベクターを含む。この配列は、前方または逆方向で挿入され得る。この点に因しある好ましい具体例では、構築物はさらに、例えば配列に機能し得るように結合されたプロモーターを含む調節配列を含む。多數の適当なベクターおよびプロモーターは、当業者には周知であり、本発明での使用に適した多くの市販ベクターが存在する。

【0119】市販されている次のベクターを例として挙げる。細菌での使用に好ましいベクターには、キアゲンから入手可能なpQE70、pQE60およびpQE-9、ストラタジーンから入手可能なpBSPベクター、Phagescriptベクター、Bluescriptベクター、pNH8

A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、およびファーマシアから入手可能なptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5がある。好ましい真核生物ベクターには、ストラタジーンから入手可能なpWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG、およびファーマシアから入手可能なpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVLがある。これらのベクターは、本発明のこの態様による使用を目的として当業者に利用可能である多くの市販されている公知ベクターの実例として列挙されているに過ぎない。宿主における本発明ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの例えば導入、維持、増殖または発現に適した他のプラスミドまたはベクターがあれば、それも本発明のこの態様で使用され得るものとする。

【0120】プロモーター領域は、候補プロモーターフラグメント、すなわちプロモーターを含み得るフラグメントを導入するための制限部位（複数も可）の下流に、プロモーター領域を欠くリポーター転写単位、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスクレオチド（「CAT」）転写単位を含むベクターを用いて所望の遺伝子から選択され得る。公知のことであるが、cat遺伝子の上流の制限部位でのプロモーター含有フラグメントをベクターへ導入すると、CAT活性の発生が誘発され、これは限界CAT検定により検出され得る。この目的に適したベクターは、公知であり、容易に入手され得る。これら2つのベクターは、pKK232-8およびpCM7である。すなわち、本発明のポリヌクレオチドの発現用プロモーターは、公知の容易に利用可能なプロモーターだけでなく、リポーター遺伝子を用いて前述の技術により容易に得られるプロモーターをも包含する。

【0121】本発明によるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現に適した既知原核生物プロモーターには、エシェリヒア・コリ(E.coli) lacI およびlacZ およびプロモーター、T3およびT7プロモーター、gptプロモーター、ラムダPR, PLプロモーターおよびtrpプロモーターがある。

【0122】この点に関して適当な既知真核生物プロモーターには、CMV即時型プロモーター、HSVチミンキナーゼプロモーター、初期および後期SV40プロモーター、レトロウイルスLTRのプロモーター、例えばラウス肉腫ウイルス（「RSV」）のプロモーター、およびメタロチオネインプロモーター、例えばマウスマタロチオネイン-1プロモーターがある。

【0123】宿主細胞での発現に適当なベクターおよびプロモーターの選択は、よく知られた方法であり、発現ベクター構築、宿主へのベクターの導入および宿主における発現に必要な技術は、当業界における常用技術である。本発明はまた、前記で検討された前記構築物を含む宿主細胞に関するものである。宿主細胞は、高等真核生物細胞、例えば哺乳類細胞または下等真核生物細胞、例

えば酵母細胞であり得るか、または宿主細胞は原核生物細胞、例えば細菌細胞であり得る。

【0124】宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストランによるトランスフェクション、カチオン性脂質によるトランスフェクション、電気穿孔、形質導入、切屑ローティング、弾道導入、感染または他の方法により行われ得る。前記方法は、多くの標準実験マニュアル、例えばデービスら(1986)「ベーシック・メソッド・イン・モレキュラー・バイオロジー」(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY)、およびサムブルックら、(1989)「モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリ・マニュアル」(MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL)、第2版(コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク)に記載されている。

【0125】宿主細胞における構築物を慣用的方法で用いることにより、組換え配列によりコードされた遺伝子産物が製造され得る。別法として、本発明ポリペプチドは、慣用的ペプチド合成装置により合成的に製造され得る。成熟タンパク質は、適当なプロモーターの制御下で哺乳類細胞、酵母、細菌または他の細胞において発現され得る。また、細胞不含有翻訳系を使用することにより、本発明のDNA構築物から誘導されたRNAを用いて前記タンパク質が製造され得る。原核生物および真核生物宿主での使用に適したクローニングおよび発現ベクターは、サムブルックら、(1989)「モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリ・マニュアル」(MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL)、第2版(コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク)に記載されている。

【0126】一般に、組換え発現ベクターは、複製起点、下流構造遺伝子の転写を指令する高度発現遺伝子から誘導されたプロモーター、およびベクターに囲んだ後にベクター含有細胞の単離を可能にする選択可能なマークーを含む。適当なプロモーターには、解糖酵素、例えば、特に、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(「PGK」)、a因子、酸性ホスファターゼおよび熱ショックタンパク質をコードする遺伝子から誘導されたものがある。選択可能なマークーには、エシェリヒア・コリ(E. coli)のアンピシリン耐性遺伝子およびスタフィロコッカス・セレビシエ(S. cerevisiae)のtrp 1遺伝子がある。

【0127】高等真核生物による本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクターへエンハンサー配列を挿入することにより高められ得る。エンハンサーはDNAのシス作用性成分であり、通常約10~300bpで、所定の宿主細胞型におけるプロモーターの転写活性を高める作用がある。エンハンサーの例には、bp 100~270で複製起点の後間に位置するSV40エ

ンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後間にあるポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーがある。

【0128】本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの異種構造配列をコードするもので、一般に、それが発現用プロモーターに機能し得るように結合されるように標準技術を用いてベクター中に挿入される。ポリヌクレオチドは、転写開始部位がリボソーム結合部位に対して約5'に存在するように位置決定される。リボソーム結合部位は、発現されるポリペプチドの翻訳を開始させるAUGに対して5'である。一般に、開始コドン、通常AUGで始まる他の読み取り枠は存在せず、リボソーム結合部位および開始AUG間に存在する。また、一般に、ポリペプチド端部に翻訳停止コドンが存在し、ポリアデニル化シグナルおよび転写終結シグナルが転写領域の3'端部に適当に配置されている。

【0129】翻訳されたタンパク質を小胞体のルーメン、周辺腔または細胞外環境へ分泌させるために、適当な分泌シグナルが発現されたポリペプチド中に組み込まれ得る。これらのシグナルはポリペプチドにとては内在性であり得るか、またはそれらは異種シグナルであり得る。

【0130】ポリペプチドは、修飾形態、例えば融合タンパク質で発現され得、分泌シグナルおよび追加的異種機能性領域を含み得る。すなわち、例えば、追加アミノ酸、特に荷電アミノ酸の領域をポリペプチドのN-末端に付加することにより、精製中または後続の操作および貯蔵中の宿主細胞における安定性および持続性が改善され得る。また、領域をポリペプチドに加えることにより、精製が容易になり得る。前記領域は、ポリペプチドの最終生成段階前に除去され得る。ポリペプチドにペプチド部分を付加すると、特に、分泌または排出が誘発され、安定性が改善され、または精製が容易になるが、これらは当業界における慣用的常用技術である。好ましい融合タンパク質は、ポリペプチドの可溶化または精製に有用な免疫グロブリンからの異種領域を含む。例えば、EP-A-O 464533(カナダ国対応出願2045869)は、免疫グロブリン分子の不变領域の様々な部分を別のひとタンパク質またはその一部と共に含む融合タンパク質について開示している。多くの場合、融合タンパク質におけるFc部分は、治療および診断での使用に非常に有利であることから、例えば薬物動態特性が改善される(EP-A 0232262参照)。他方、用途によっては、融合タンパク質が記載された有利な方法で発現され、検出され、精製された後にFc部分を欠失することができれば望ましい場合もある。これは、Fcタンパク質が検定、治療または診断での使用にとって障害となることが判った場合、例えば融合タンパク質が免疫化用の抗原として使用される場合である。薬剤の発見では、hIL-5のアンタゴニストを同定するための高スロ

一アットスクリーニング検定を目的として、例えばひとつタンパク質、例えばshIL-5をFc部分と融合させた。D. ベネットら、(1995)「ジャーナル・オブ・モレキュラー・レコグニション」(Journal of Molecular Recognition)、8巻、52-58およびK. ヨハンソンら(1995)「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」(The Journal of Biological Chemistry)、270巻、16号、9459-9471頁参照。

【0131】本発明によるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの増殖、維持または発現に適当な原核動物宿主には、ストレプトコッカス、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)、バシルス・スブチリス(Bacillus subtilis)およびサルモネラ・チフィムリウム(Salmonella typhimurium)がある。様々な種類のショードモナス(Pseudomonas)、ストレプトマイシス(Streptomyces)およびスタフィロコッカス(Staphylococcus)もまたこのことに関して適当な宿主である。さらに、熟練者に知られている多くの他の宿主もまたこのことに関して使用され得る。

【0132】代表的ではあるが非限定的な例として、細菌使用に有用な発現ベクターは、選択可能なマーカーおよび公知クローニングベクターpBR322(ATCC 37017)の遺伝成分を含む市販のプラスミドから誘導された細菌性複製起点を含み得る。前記の市販ベクターには、例えばpKK223-3(ファーマシア・ファイン・ケミカルズ、ウツサラ、スエーデン)およびGEM1(プロメガ・バイオテック、マディソン、ウィスコンシン、アメリカ合衆国)がある。これらのpBR322「バックボーン」部分を、適当なプロモーターおよび発現される構造配列と組合わせる。

【0133】適当な宿主株を形質転換し、宿主株を適当な細胞密度まで生長させた後、選択されたプロモーターが誘導可能な場合、それを適当な手段(例、温度シフトまたは化学的誘導物質に暴露)により誘導し、細胞をさらにある期間培養する。次いで、一般的には細胞を、遠心分離により採取し、物理的または化学的手段により破壊し、生成した粗抽出物をさらなる精製用に確保しておく。タンパク質発現で使用される微生物細胞は、凍結解凍循環処理、音波処理、機械的破壊または細胞溶解剤の使用を含む好都合な方法により破壊され得、それらの方法は当業者によく知られたものである。

【0134】様々な哺乳類細胞培養系も同じく発現用に使用され得る。哺乳類発現系の例には、グルツマンら(1981)「セル」(Cell)23:175に記載されたる腎臓雄芽細胞のCOS-7ラインがある。和合性ベクターを発現し得る他のセルラインには、例えばC127、3T3、CHO、ヒーラ、ひと腎臓293およびBHKセルラインがある。

【0135】哺乳類発現ベクターは、複製起点、適当なプロモーターおよびエンハンサー、およびまた必要なり。

ポゾーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与および受容部位、転写終結配列、および発現に必要な5'フランギング-非転写配列を含み得る。このことについてある好ましい具体例では、SV40スプライス部位から誘導されたDNA配列およびSV40ポリアデニル化部位は、これらのタイプの必要とされる非転写遺伝成分に使用される。

【0136】FAB Iポリペプチドは、公知方法、例えば硫酸アンモニウムまたはエタノール沈澱、酸抽出、10 アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティー・クロマトグラフィー、ヒドロキシルアバタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーにより、組換え細胞培養物から採取および精製され得る。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー(「HPLC」)が精製に使用される。単離中および/または精製中にポリペプチドに変性が起こった場合、再生タンパク質に関する公知技術を用いることにより、活性立体配座が再生され得る。本発明はまた、精製中におけるFAB I検出に関する抗FAB I抗体の用途を提供する。

【0137】本発明のポリペプチドは、天然精製産物、化学的合成方法による生成物、および例えば細菌、酵母、高等植物、昆虫および哺乳類細胞を含む原核生物または真核生物宿主からの組換え技術により製造される生成物を包含する。組換え製造方法で使用される宿主によって、本発明のポリペプチドは、グリコシル化され得る場合もあれば非グリコシル化され得る場合もある。さらに、本発明ポリペプチドはまた、宿主仲介方法の結果として場合によっては、開始修飾メチオニン残基を含み得る。

【0138】FAB Iポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、様々な適用法、特にFAB Iの化学および生物特性を利用する場合に本発明に従い使用され得る。追加的適用法は、細胞、組織および生物体の疾病の診断および処置に関するものである。本発明のこれらの態様は、さらに下記検討事項により説明されている。

#### 【0139】ポリヌクレオチド検定

本発明はまた、例えば診断試薬として相補的ポリヌクレオチドを検出するFAB Iポリヌクレオチドの用途に関するものである。真核生物、特に哺乳類および特にひとにおけるFAB Iの検出により、疾病の診断に加わるか、これを明確にするか可能にし得る診断方法が提供される。FAB I遺伝子をもつ真核生物(ここでは「個体(複数も可)」とも言う)、特に哺乳類、および特にひとは、様々な技術によりDNAレベルで検出され得る。診断用の核酸は、個体の細胞および組織、例えば骨、血液、筋肉、軟骨および皮膚から得られる。組織生検および剖検材料はまた、個体からの試料に関する診断的検定で使用するのに好ましい。ゲノムDNAは、検出

用に直接使用され得るか、または分析前にPCRを用いることにより酵素的に増幅され得る。PCR(サイキラ、(1986)「ネイチャー」(Nature)、324:163-166)。RNAまたはcDNAもまた、同じ方法で使用され得る。一例として、FAB Iをコードする核酸に相補的なPCRプライマーを用いることにより、FAB Iの存在および発現が同定および分析され得る。PCRを用いると、真核生物、特に哺乳類、および特にひとに存在する原核生物株の特性確認が、原核生物遺伝子の遺伝子型の分析により行われ得る。例えば、欠失および挿入は、レファレンス配列の遺伝子型と比較した増幅産物の大きさの変化により検出され得る。点突然変異は、増幅DNAを放射性標識FAB I RNAまたは別法として放射性標識FAB IアンチセンスDNA配列とハイブリダイズさせることにより確認され得る。完全に対合した配列は、リボヌクレアーゼA消化または融解温度差異により誤対合二重らせんから区別され得る。

【0140】レファレンス遺伝子および突然変異をもつ遺伝子間の配列差異は、直接DNA配列決定により示され得る。さらに、クローン化DNA切片は、特異的DNA切片を検出するためのプローブとして使用され得る。前記方法の感度は、PCRの適当な使用または別の増幅方法により大幅に高められ得る。例えば、配列決定プライマーは、2本鎖PCR産物または修飾PCRにより生成される1本鎖錠型分子と共に使用される。配列決定は、放射性標識ヌクレオチドでの慣用的方法または蛍光標識による自動配列決定方法により行われる。

【0141】DNA配列差異に基づく遺伝子試験は、変性剤の存在または非存在下、ゲルにおけるDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化を検出することにより達成され得る。小さな配列欠失および挿入でも、高分離度ゲル電気泳動により視覚化され得る。配列の異なるDNAフラグメントは、異なるDNAフラグメントの移動度が、それらの特異的な融解または部分融解温度により異なる位置のゲルにおいて保持される変性ホルムアミド勾配ゲルで区別され得る(例えば、マイアーズら、(1985)「サイエンス」(Science)、230:1242参照)。

【0142】また、特定位置における配列変化は、ヌクレアーゼ防御検定、例えばリボヌクレアーゼおよびS1防御または化学的開裂方法(例、コットンら、(1985)「プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ」(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA)、\*

\*85:4397-4401)により明らかにされ得る。【0143】すなわち、特定DNA配列の検出は、例えばハイブリダイゼーション、リボヌクレアーゼ防御、化学的開裂、直接DNA配列決定または制限酵素(例、制限断片長多型('RFLP'))の使用およびゲノムDNAのサザーンプロッティング方法により達成され得る。さらに慣用的なゲル電気泳動およびDNA配列決定法に加えて、突然変異はまたin situ分析により検出され得る。

- 10 【0144】突然変異は、例えばDNA配列決定法により確認され得る。当業界公知の方法で試料を処理することにより、RNAを捕獲する。mRNAにおける一領域とハイブリダイズする配列から成るオリゴヌクレオチドプライマーを加えることにより、RNA試料から第1鎖cDNAを合成する。逆転写酵素およびデオキシヌクレオチドを加えることにより、第1鎖cDNAが合成され得る。プライマー配列は、本発明のFAB Iタンパク質のDNA配列に基づいて合成される。プライマー配列は、一般に少なくとも15連続塩基から成り、少なくとも30またはちょうど50連続塩基を含み得る。
- 20 【0145】本発明の遺伝子における突然変異をもつ細胞はまた、様々な技術によりDNAレベルで検出され得、例えば血清型決定が行われる。診断用核酸は、血液、尿、唾液、組織生検および剖検材料を含む(これらに限定はされない)個体の細胞または体液から得られる。ゲノムDNAは、検出用に直接使用され得るか、または分析前にPCRを用いることにより(サイキラ、(1986)「ネイチャー」(Nature)、324:163-166)酵素的に増幅され得る。RT-PCRはまた、突然変異の検出にも使用され得る。自動検出システム、例えばジーンスキャナーと共にRT-PCRを使用するのが特に好ましい。RNAまたはcDNAはまた、同じ目的、PCRまたはRT-PCRに使用され得る。一例として、FAB Iをコードする核酸に相補的なPCRプライマーを用いることにより、突然変異を同定および分析することができる。代表的プライマーの例を下記表1に示す。例えば、欠失および挿入は、正常遺伝子型と比較した増幅産物の大きさの変化により検出され得る。点突然変異は、増幅されたDNAを放射性標識RNAまたは別法として放射性標識アンチセンスDNA配列とハイブリダイズすることにより同定され得る。完全対合配列は、リボヌクレアーゼA消化または融解温度差により誤対合二重らせんとは区別され得る。
- 30 【0146】
- 40 【表1】

#### FAB I遺伝子における突然変異の検出に使用されるプライマー

##### 配列番号:

##### 配列

3 5'-OGCTCGAGATGTTAAATCTGAAAACAAACATATGTC-3'  
4 5'-CGCGGATCCAATCAAGTCAGGTTGAAATATCCA-3'

【0147】前記プライマーは、個体から誘導された試料から単離されたFAB I DNAの増幅に使用され得

る。本発明はまた、1、2、3または4ヌクレオチドが5'および/または3'末端から除去された表1のプライマーを提供する。プライマーを使用することにより、個体から単離された遺伝子が増幅され得、その結果、次に遺伝子に対してDNA配列を解明するための様々な技術が行われ得る。この方法で、DNA配列における突然変異を測定することにより、例えば生物体の血清型が確認され得る。

【0148】レファレンス遺伝子および突然変異を有する遺伝子間の配列差異は、直接DNA配列決定方法により明らかにされ得る。さらに、クローン化DNAセグメントは、特異的DNAセグメントを検出するためのプローブとして使用され得る。この方法の感度は、PCRと組み合わせると大きく高められる。例えば、配列決定プライマーは、2本鎖PCR産物または修飾PCRにより生成された1本鎖偽型分子と共に使用される。配列決定は、放射性標識ヌクレオチドによる慣用的方法または蛍光性標識による自動的配列決定方法により行われる。

【0149】DNA配列差異に基づく遺伝子型決定は、変性剤の存在または非存在下、ゲルにおけるDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化を検出することにより達成され得る。小さな配列欠失および挿入でも、高分離度ゲル電気泳動により視覚化され得る。配列が異なるDNAフラグメントは、異なるDNAフラグメントの移動度が、それらの特異的融解または部分融解温度により異なる位置でのゲルにおいて保持される変性ホルムアミド勾配ゲルにおいて区別され得る（例えば、マイアーズら、(1985)「サイエンス」(Science)、230:1242参照）。

【0150】また、特定位置における配列変化は、ヌクレアーゼ防御検定、例えばリボヌクレアーゼおよびS1防御または化学的開裂方法（例、コットンら、(1985)「プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイティッド・ステーツ・オブ・アメリカ」(PNAS, USA)、85:4397-4401）により明らかにされ得る。

【0151】すなわち、特定DNA配列の検出および/または配列レベルの定量は、例えばハイブリダイゼーション、リボヌクレアーゼ防御、化学的開裂、直接DNA配列決定または制限酵素（例、制限断片長多型（「RFLP」））の使用およびゲノムDNAのザザーンプロッティング方法により達成され得る。本発明は、疾病、特に細菌感染症、さらに特定すればスタフィロコッカス感染症の診断方法であって、図2【配列番号1】の配列を有するポリヌクレオチドの増加した発現レベルを個体から誘導された試料から測定することを含む方法を提供する。ポリヌクレオチドの発現増加は、ポリヌクレオチドの定量に関する当業界公知の方法のいずれか一つ、例えばPCR、RT-PCR、リボヌクレアーゼ防御、ノーザンプロッティングおよび他のハイブリダイゼーション

方法を用いて測定され得る。より慣用的なゲル電気泳動およびDNA配列決定法に加えて、突然変異はまたin situ分析により検出され得る。

#### 【0152】ポリペプチド検定

本発明はまた、診断的検定法、例えば正常および異常レベルの測定を含む、細胞および組織におけるFAB Iタンパク質のレベルを検出する定量的および診断的検定法に関するものである。すなわち、例えば、正常対照組織試料と比較したFAB Iタンパク質の病的発現レベルを検出するための本発明による診断的検定法は、例えば細菌感染の存在の検出に使用され得る。宿主から誘導された試料におけるタンパク質、例えば本発明のFAB Iタンパク質のレベル測定に使用され得る検定技術

- 10 は、当業者には熟知されている。前記の検定方法には、ラジオイムノアッセイ、競合的結合検定、ウエスタンブロット分析およびELISA検定法がある。これらの中ではELISAが好ましい場合が多い。ELISA検定では、まずFAB Iに特異的な抗体、好ましくはモノクローナル抗体を製造する。さらに、モノクローナル抗体に結合するリポーター抗体が一般的に製造される。リポーター抗体は、検出可能な試薬、例えば放射性、蛍光性または酵素試薬、この実施例では西洋わさびペルオキシダーゼ酵素に結合される。

【0153】ELISAを実施するため、試料を宿主から除き、試料中のタンパク質と結合する固体支持体、例えばポリスチレン皿でインキュベーションする。次いで、皿に遊離タンパク質結合部位があれば、非特異的タンパク質例えば牛血清アルブミンとインキュベーションすることによりそれらを覆う。次に、モノクローナル抗体を皿においてインキュベーションすると、その間にポリスチレン皿に結合されたFAB Iタンパク質があればそれにモノクローナル抗体が結合する。非結合モノクローナル抗体を緩衝液により洗浄する。西洋わさびペルオキシダーゼに結合されたリポーター抗体を皿に入れると、FAB Iに結合したモノクローナル抗体があればそれにリポーター抗体が結合する。次いで非結合リポーター抗体を洗浄する。次いで、比色用基質を含むペルオキシダーゼ活性に関する試薬を皿に加える。一次および二次抗体を通じてFAB Iに結合された固定化ペルオキシダーゼにより、着色した反応産物が生成される。所定の期間における発色量は、試料中に存在するFAB Iタンパク質の量を示す。定量的結果は、一般に標準曲線を参照することにより得られる。

【0154】競合検定法は、固体支持体に結合させたFAB Iに特異的な抗体および標識FAB Iおよび個体から誘導された試料を固体支持体上に通すと、固体支持体に結合した検出された標識の量が試料中のFAB Iの量に相関し得る場合に使用され得る。

#### 【0155】抗体

- 50 ポリペプチド、それらのフラグメントまたは他の誘導

体、またはその類似体またはそれらを発現する細胞は免疫原として使用され、それに対して抗体が生産され得る。これらの抗体は、例えばポリクローナルまたはモノクローナル抗体であり得る。本発明はまた、キメラ、1本鎖およびヒューマナイズド抗体、並びにF<sub>a</sub>bフラグメント、またはF<sub>a</sub>b発現ライブラリーの生成物を包含する。当業界で公知の様々な方法が、前記抗体およびフラグメントの製造に使用され得る。

【0156】本発明の配列に対応するポリペプチドに対して產生された抗体は、ポリペプチドを個体に直接注射するかまたは好ましくはヒト以外の個体にポリペプチドを投与することにより得られる。次いで、こうして得られた抗体は、ポリペプチド自体に結合する。この方法では、ポリペプチドのフラグメントのみをコードする配列でさえ、未変性ポリペプチド全体に結合する抗体を生成するのに使用され得る。次に、前記抗体は、そのポリペプチドを発現する組織からポリペプチドを単離するのに使用され得る。

【0157】モノクローナル抗体を製造する場合、連続セルライン培養物により產生される抗体を提供するものであれば、いかなる技術でも使用され得る。例としては、ハイブリドーマ技術（コーラー、G.ら、（1975）「ネイチャー」（Nature）256：495-497）、トリオーマ技術、ひとB細胞ハイブリドーマ技術（コツバーら、（1983）「イムノロジー・トゥデー」（Immunology Today）4：72）およびひとモノクローナル抗体を製造するためのEBV-ハイブリドーマ技術（コールら、（1985）、「モノクローナル・アンティボディーズ・アンド・キャンサー・セラピー」（Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy）中、アランR.リス、インコーポレイテッド、77-96頁）がある。

【0158】1本鎖抗体の製造に関して報告された技術（米国特許第4946778号）は、本発明の免疫原性ポリペプチド産物に対して1本鎖抗体を製造するのに適合化され得る。また、トランスジェニックマウスまたは他の生物体、例えば他の哺乳類は、本発明の免疫原性ポリペプチド産物に対してヒューマナイズド（人化）抗体を発現させるのに使用され得る。

【0159】ポリペプチド誘導体は、本発明の特定態様を形成する抗原的または免疫学的に均等な誘導体を包含する。本明細書で使用されている「抗原的に均等な誘導体」の語は、本発明によるタンパク質またはポリペプチドに対して產生されると、病原体および哺乳類宿主間の即時物理的相互作用を妨げるある種の抗体により特異的に認識されるポリペプチドまたはその均等物を包含する。

【0160】ここで使用されている「免疫学的に均等な誘導体」の語は、脊椎動物において抗体が產生されるために適当な製剤中で使用されると、抗体が病原体および

哺乳類宿主間の即時物理的相互作用を妨げるべく作用するペプチドまたはその均等物を包含する。

【0161】ポリペプチド、例えば抗原的または免疫学的に均等な誘導体またはその融合タンパク質は、マウスまたは他の動物、例えばラットまたはにわとりを免疫化するための抗原として使用される。融合タンパク質は、ポリペプチドに安定性を付与し得る。抗原は、例えばコンジュゲーションにより免疫原性担体タンパク質、例えば牛血清アルブミン（BSA）またはキーホールリンベットヘモシアニン（KLH）と会合され得る。別法として、多数コピーのタンパク質またはポリペプチドを含む多重抗原性ペプチドまたはその抗原的または免疫学的に均等なポリペプチドは、十分な抗原性を有するために免疫原性が改善されることにより担体の使用が回避され得る。

【0162】コーラーら、（1975）「ネイチャー」（Nature）256、495-497）の方法を用いると、免疫化された哺乳類からの抗体含有細胞を骨髄腫細胞と融合することにより、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞が生成される。

【0163】1種またはそれ以上の本来のポリペプチドおよび/または融合タンパク質を用いて、他の種類のスタフィロコッカスとの高い結合親和力および好ましい交差反応性を有するセルラインを選択するため、ハイブリドーマをスクリーニングにかける。選択されたセルラインを培養することにより、所望のMabが得られる。モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマセルラインは、本発明のさらに別の態様である。

【0164】別法として、ファージディスプレー技術を

30 利用することにより、抗F<sub>b</sub>pを有することについてスクリーニングされたひとからのリンパ球のPCR増幅V-遺伝子のレパートリーまたは特定の実験を受けたことがないライブラリーからポリペプチドに対して結合活性をもつ抗体遺伝子が選択され得る（マッカファーティー、J.ら、（1990）、「ネイチャー」（Nature）348、552-554、マークス、J.ら、（1992）「バイオテクノロジー」（Biotechnology）10、779-783）。これらの抗体の親和力はまた、鎖シャッフリングにより改善され得る（クラックソン、T.ら、（1991）「ネイチャー」（Nature）352、624-628）。

【0165】ポリペプチドおよび/または融合タンパク質に対する高い親和力について抗体を再度スクリーニングするべきである。前記抗体は、アフィニティー・クロマトグラフィーにより単離および精製するため固体支持体に抗体を結合させることにより、ポリペプチドを発現するクローンの単離または同定または本発明ポリペプチドの精製に使用され得る。

【0166】前記ポリペプチドを宿主の予防接種用抗原として使用すると、例えば損傷組織への細菌の付着を遮

断することにより細菌の侵入を防御する特異抗体が產生され得る。組織損傷の例には、機械的、外傷的、化学的または熱損傷または留置装置の内植により誘発された皮膚または結合組織における傷、または粘膜、例えば口、乳腺、尿道または腎における傷がある。

【0167】ポリペプチドまたはそれらを発現する細胞は免疫原として使用され、それに対して抗体が產生され得る。これらの抗体は、例えばポリクローナルまたはモノクローナル抗体であり得る。抗体という語はまた、キメラ、1本鎖およびヒューマナイズド抗体、並びにFab bフラグメント、またはFab発現ライブラリーの生成物を包含する。当業界で公知の様々な方法が、前記抗体およびフラグメントの製造に使用され得る。

【0168】本発明の配列に対応するポリペプチドに対して產生された抗体は、ポリペプチドを個体に直接注射するかまたは好ましくはひと以外の個体にポリペプチドを投与することにより得られる。次いで、こうして得られた抗体は、ポリペプチド自体に結合する。この方法では、ポリペプチドのフラグメントのみをコードする配列でさえ、未変性ポリペプチド全体に結合する抗体を生成するのに使用され得る。次に、前記抗体は、そのポリペプチドを発現する組織からポリペプチドを単離するのに使用され得る。

【0169】前記したところによると、最終抗体のフラグメントが製造され得る。抗体は、Mr約150000の無傷の抗体またはその誘導体、例えばFabフラグメントまたはFvフラグメントであり得、これらはスケラ、Aおよびブルックツン、A(1988)「サイエンス」(Science)240、1038-1040に記載されている。2つの抗原結合性ドメインが存在する場合、各ドメインは「二重特異性」抗体と呼ばれる異なる抗原決定基に対して指向され得る。

【0170】本発明の抗体は、慣用的手段により、例えば確立されたモノクローナル抗体テクノロジー(コーラー、G.ら、(1975)、「ネイチャー」(Nature)256、495-497)または組換え手段、例えば組み合わせライブラリー、例えばヒューズ、W.D.ら、(1989)「サイエンス」(Science)246、1275-1281に記載されたものを用いることにより製造され得る。

【0171】好ましくは、抗体は、本発明ポリペプチドを発現させるための適当な発現系、例えば前記のものにおける前記抗体をコードするDNAポリマーの発現により製造される。発現系に関するベクターの選択は、一つには原核生物細胞、例えばエシレリヒア・コリ(E.coli)(好ましくはB株)またはストレプトマイシス類、または真核生物細胞、例えばマウスC127、マウス骨髄腫、ヒトヒーラ、チャイニーズハムスター卵巣、糸状菌または単細胞真菌または昆虫細胞であり得る宿主により決定される。宿主はまた、トランスジェニック動物また

はトランスジェニック植物、例えばヒアット、Aら、(1989)「ネイチャー」(Nature)34、76-78に記載されたものであり得る。適当なベクターには、例えばバキュロウイルス類およびワクシニアから誘導されたプラスミド、バクテリオファージ、コスミドおよび組換えウイルスがある。

【0172】Fabフラグメントはまた、例えばババインを用いる酵素処理によってFc部分からFab部分が開裂されることにより、その親モノクローナル抗体から製造され得る。

【0173】好ましくは、抗体またはその誘導体は、個体における免疫原性を低くするように修飾される。例えば、個体がひとであるならば、ハイブリドーマ誘導抗体の相補性(cocomplementarity)決定性領域(複数も可)がひとモノクローナル抗体、例えばショーンズ、P.ら(1986)、「ネイチャー」(Nature)321、522-525またはテンペストら、(1991)「バイオテクノロジー」(Biotechnology)9、266-273記載のものに移植された場合、抗体は最も好ましく「ヒューマナイズド(ヒト化)」され得る。

【0174】修飾は、「ヒューマナイゼーション」の一つに限定される必要はない。他の盤長類配列(例えばニューマン、R.ら、1992、「バイオテクノロジー」(Biotechnology)10、1455-1460)も使用され得る。ヒト化モノクローナル抗体、または結合活性を有するそのフラグメントは、本発明の特定態様を構成する。

【0175】本発明は、哺乳類細胞に対するFABIタンパク質または活性フラグメントの相互作用を妨げるものの同定する薬剤のスクリーニング方法であって、薬剤の存在下で標識ポリペプチドと哺乳類細胞または膜標本をインキュベーションし、この相互作用を薬剤が遮断する能力を測定することを含む方法を提供する。

【0176】遺伝的免疫化において本発明ポリヌクレオチドを使用する場合、好ましくは適当な送達方法、例えば筋肉へのプラスミドDNAの直接注射(ウォルフら、(1992)ハム・モル・ジェネット(Hum Mol Genet)、1:363、マントルベラ、(1963)ハム・シン・セル(Hum. Gene Ther.)4、419)、特異的タン

40 パク質担体とDNAによる複合体のデリバリー(ウーラ、(1989)「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」(J Biol Chem)264、16985)、リン酸カルシウムとDNAの共沈澱(ベンヴェニスティーおよびレシェフ、PNAS、1986:83、9551)、様々な形態のリボソームでのDNAの封入(カネダら、(1989)「サイエンス」(Science)243、375)、粒子ポンバード(タングラ、(1992)「ネイチャー」(Nature)356:152、アイゼンブラウンら、(1993)「DNA Cell Biol」12:791)およびクローン化

レトロウイルス性ベクターを用いるインピボ感染（シーガーら、(1984) PNAS 81, 5849）を使用する。筋肉トランスフェクションに適したプロモーターには、CMV、RSV、SRa、アクチン、MCK、アルファグロビン、アデノウイルスおよびジヒドロ葉酸レダクターゼがある。

【0177】すなわち、特に、FAB Iに対する抗体が、FASまたはFAB I酵素活性またはFAB I発現の阻害に使用され得る。FAB Iはまた、感染症、例えば上気道感染（例、中耳炎、細菌性気管炎、急性喉頭蓋炎、甲状腺炎）、下気道感染（例、蓄膿、肺膜瘍）、心臓感染（例、感染性心内膜炎）、消化器感染（例、分泌性下痢、脾臓膜瘍、腹膜後膜瘍）、CNS感染（例、脳膜瘍）、眼感染（例、眼瞼炎、結膜炎、角膜炎、眼球内炎、前隔膜および眼窩蜂巢炎、涙腺炎）、腎および泌尿管感染（例、副睾丸炎、腎内性および腎周囲膜瘍、毒性ショック症候群）、皮膚感染（例、膿瘍、毛包炎、皮膚臓瘍、蜂巣炎、外傷感染、細菌性筋炎）ならびに骨および関節感染（例、敗血性関節炎、骨髓炎）（これらに限定はされない）の阻害に使用され得る。

【0178】FAB Iはまた、細菌感染、例えば上気道感染（例、中耳炎、細菌性気管炎、急性喉頭蓋炎、甲状腺炎）、下気道感染（例、蓄膿、肺膜瘍）、心臓感染（例、感染性心内膜炎）、消化器感染（例、分泌性下痢、脾臓膜瘍、腹膜後膜瘍）、CNS感染（例、脳膜瘍）、眼感染（例、眼瞼炎、結膜炎、角膜炎、眼球内炎、前隔膜および眼窩蜂巢炎、涙腺炎）、腎および泌尿管感染（例、副睾丸炎、腎内性および腎周囲膜瘍、毒性ショック症候群）、皮膚感染（例、膿瘍、毛包炎、皮膚臓瘍、蜂巣炎、外傷感染、細菌性筋炎）ならびに骨および関節感染（例、敗血性関節炎、骨髓炎）の治療に使用され得る。

#### 【0179】FAB I結合性分子および検定

本発明はまた、FAB Iに結合する分子、例えば結合性分子の同定方法を提供する。FAB Iに結合するタンパク質、例えば結合性タンパク質をコードする遺伝子は、当業者に知られている様々な方法により同定され得る。前記方法の例は、多くの実験マニュアル、例えばコリガルら、(1991)「カレント・プロトコルズ・イン・イムノロジー」(Current Protocols in Immunology) 1 (2) : 第5章に記載されている。

【0180】例えば、発現クローニングは、この目的のために使用され得る。このために、FAB Iに反応する遺伝子を個体において単離するため、ポリアデニル化RNAをFAB Iに応答する細胞から製造し、cDNAライブラリーをこのRNAから作製し、ライブラリーをプールに分割し、プールをFAB Iには応答しない細胞へ個々にトランスフェクションする。次いで、トランスフェクションされた細胞を標識FAB Iに曝す。(FAB Iは、放射性よう素化または部位特異的タン

パク質キナーゼに関する認識部位の封入の標準的方法を含む様々な公知技術により標識され得る。) 曝した後、細胞を固定し、FAB Iの結合を測定する。これらの処理は、好都合にはガラス製スライドで行われる。

【0181】別法として、標識リガンドは、細胞抽出物、例えばそれが結合する分子、例えば結合性分子を発現する細胞から製造された、膜または膜抽出物に光親和性結合され得る。架橋材料を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（「PAGE」）により分割し、X線フィルムに曝す。リガンド結合を含む標識複合体は、切除され、ペプチドフラグメントに分割され、タンパク質ミクロシークエンシングにかけられ得る。ミクロシークエンシングから得られたアミノ酸配列を用いることにより、cDNAライブラリーをスクリーニングして、推定的結合性分子をコードする遺伝子を同定するための特有または変性オリゴヌクレオチドプローブが設計され得る。本発明のポリペプチドはまた、細胞または細胞不含有製品における結合性分子、例えばFAB I結合性分子のFAB I結合能力の評価に使用され得る。

【0182】アンタゴニストおよびアゴニスト検定および分子

本発明はまた、細胞に対するFAB Iの作用、例えば結合性分子、例えばFAB I結合性分子とのその相互作用を強化または遮断するものを同定するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。アンタゴニストは、FAB I本来の生物学的機能を低下させる化合物である。アゴニストは、FAB I本来の生物学的機能を高める化合物である。

【0183】例えば、細胞成分、例えば膜、細胞エンベロープまたは細胞壁、またはそれらの製品は、FAB Iに結合する分子、例えば生理学的経路、例えば調節経路、例えばFAS経路がFAB Iにより調節または影響される分子を発現する細胞から製造され得る。FAB Iアゴニストまたはアンタゴニストであり得る候補分子の非存在または存在下、前記製品を標識FAB Iとインキュベーションする。候補分子が結合性分子と結合する能力は、標識リガンドの結合性低下に反映される。無價で、すなわちFAB I結合性分子との結合に対するFAB Iの作用を誘導することなく結合する分子

が、優れたアンタゴニストであると最も考えられる。十分に結合し、FAB Iと同じかまたは密接に関連している作用を誘導する分子がアゴニストである。

【0184】潜在的アゴニストおよびアンタゴニストのFAB I模効果は、例えば候補分子と細胞または適当な細胞製品との相互作用後に第2メッセンジャー系の活性を測定し、FAB IまたはFAB Iと同じ効果を誘導する分子の場合と効果を比較することにより測定され得る。このことについて有用であり得る第2メッセンジャー系には、AMPグアニル酸シクラーゼ、イオンチャネルまたはホスホイノシチド加水分解第2メッセンジ

ヤー系があるが、これに限定されるわけではない。【0185】FAB Iアンタゴニストに関する検定法の別の例は、競争的阻害検定に適した条件下、FAB Iおよび潜在的アンタゴニストを膜結合FAB I結合性分子または組換えFAB I結合性分子と合わせる競合的検定法である。FAB Iは例えば放射性標識され得、その結果、結合性分子に結合されたFAB I分子の数が正確に測定されることにより、潜在的アンタゴニストの有効性が評価され得る。

【0186】スクリーンのさらに別の例は、NADHの消費を測定することによるクロトニル-C<sub>o</sub>Aの還元の検出である。クロトニル-ACPはまた、かかるスクリーンにおいてクロトニル-C<sub>o</sub>Aの代わりに使用され得る。試験化合物を反応混合物に加えて、クロトニル-C<sub>o</sub>Aまたはクロトニル-ACPの還元に対する効果を測定する。還元レベルが高められるとアゴニストが同定され得、還元レベルが低下するとアンタゴニストが同定され得る。ジアザボリンまたはパルミトイルC<sub>o</sub>Aは、拮抗作用に関する陽性対照として使用され得る。これらのスクリーンは、マイクロタイタープレートフォーマットおよびプレートリーダーを使用する高スローラップ検定で使用されるのが好ましい。

【0187】潜在的アンタゴニストには、本発明ポリペプチドに結合することにより、その活性を阻害または消去する小有根分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体がある。潜在的アンタゴニストはまた、結合性分子の同じ部位に結合する小有根分子、ペプチド、ポリペプチド、例えば密接に関連したタンパク質または抗体、例えば結合性分子であり得、FAB I誘導活性を誘導せずに、結合からFAB Iを排除することによりFAB Iの作用を阻止する。

【0188】潜在的アンタゴニストには、正常な生物活性が阻害されるように、ポリペプチドの結合部位に結合し、占有することにより結合性分子、例えば細胞結合性分子への結合を阻止する小分子がある。小分子の例には小有根分子、ペプチドまたはペプチド様分子があるが、これらに限定はされない。潜在的アンタゴニストはまた、ジアザボリン模擬物質（硫黄、炭素または酸素の代わりにほう素）および活性化イソニアジドの模擬物質を含む。

【0189】他の潜在的アンタゴニストには、アンチセンス分子がある。アンチセンステクノロジーを用いることにより、アンチセンスDNAまたはRNAまたは3重らせん形成を通じて遺伝子発現が制御され得る。アンチセンス技術は、例えばオカノ、J. (1991)「ニューロケミストリー」(Neurochem.) 56: 560、「オリゴデオキシヌクレオタイズ・アズ・アンチセンス・インヒビターズ・オブ・ジーン・エクスプレッション」(OLIGODeOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION)、CRCプレス、ボカ・レイトン、フロリ

ダ(1988)で検討されている。3重らせん形成は、例えばリーラ、(1979)「ヌクレオティック・アシックス・リサーチ」(Nucleic Acids Research) 6: 3073、クーニーら、(1988)「サイエンス」(Science) 241: 456、およびダーバンら、(1991)「サイエンス」(Science) 251: 1360で検討されている。これらの方法は、相補的DNAまたはRNAへのポリヌクレオチドの結合に基づいている。例えば、本発明の成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの5'暗号化部分は、長さ約10~40塙基対のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計するのに使用され得る。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に関与する遺伝子領域に相補的となることにより、転写およびFAB Iの生成を阻止するように設計される。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、mRNAとインビボでハイブリダイズし、mRNA分子からFAB Iポリペプチドへの翻訳を遮断する。前記オリゴヌクレオチドはまた、アンチセンスRNAまたはDNAがインビボで発現され、FAB Iの生成を阻止し得るように細胞に送達され得る。

【0190】アンタゴニストは、医療的に許容し得る担体、例えば下記のものを用いた組成物で使用され得る。アンタゴニストは、例えば上気道感染（例、中耳炎、細菌性気管炎、急性喉頭蓋炎、甲状腺炎）、下気道感染（例、肺炎、肺結核）、心臓感染（例、感染性心内膜炎）、消化器感染（例、分泌性下痢、脾臓脛癌、腹膜後脛癌）、CNS感染（例、脳膜炎）、眼感染（例、眼瞼炎、結膜炎、角膜炎、眼球内炎、前隔膜および眼窩蜂巣炎、涙腺炎）、腎および泌尿管感染（例、副睾丸炎、腎内性および腎周囲脛癌、毒性ショック症候群）、皮膚感染（例、膿瘍、毛包炎、皮膚脛癌、蜂巣炎、外傷感染、細菌性筋炎）ならびに骨および関節感染（例、敗血性関節炎、骨髓炎）（これらに限定はされない）を含む疾患の阻止に使用され得る。

【0191】ある態様において、本発明では、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは阻害剤を用いることにより、感染の発発症に関与する病原体および哺乳類宿主間の即時型物理的相互作用を妨げる。特に、本発明分子は、i) 留置装置の哺乳類細胞外マトリックスタンパク質または外傷における細胞外マトリックスタンパク質への細菌、特にグラム陽性菌の接着の阻止、ii) 例えば、哺乳類チロシンキナーゼのリン酸化を開始することによる、FAB Iタンパク質伝達哺乳類細胞侵入の遮断（ローゼンシャインら、(1992)「インフェクション・アンド・イミュニティー」(Infect. Immun.) 60, 2211-7）、iii) 組織損傷を伝達する哺乳類細胞外マトリックスタンパク質および細菌性FAB Iタンパク質間における細菌接着の遮断、および/またはiv) 内在装置の内植または他の外科的技術による以外で開始される感染における発病の通常経過の遮断に

おいて使用され得る。

【0192】アンタゴニストは、医薬的に許容し得る担体、例えば下記のものを用いた組成物で使用され得る。ここに提供されたDNA配列の各々は、抗菌性化合物の発見および開発に使用され得る。発現後のコードタンパク質は、抗菌剤のスクリーニング用の標的として使用され得る。さらに、コードタンパク質のアミノ末端領域をコードするDNA配列またはシャイン-デルガルノまたは各mRNAの他の翻訳促進性配列を用いることにより、興味の対象である暗号化配列の発現を制御するアンチセンス配列が構築され得る。

【0193】ヘモフィルス・インフルエンゼ(H.influenzae)、エシェリヒア・コリ(E.coli)およびサルモネラ・ティフィムリウム(S.typhimurium)において既知酵素によりFAB Iのアミノ酸配列が保存されていることから、本発明により提供されるFAB Iが標的とされる抗菌剤、アゴニストおよびアンタゴニスト化合物は、広い範囲のグラム陰性および陽性菌に対して活性を示すと考えられている。加えて、Fab I相同体(I nh A)が、マイコバクテリウム・ツベロクロシス(Mycobacterium tuberculosis)で同定された。従って、FAB Iが標的とされる本発明により提供される抗菌剤はまた、抗マイコバクテリア活性を有し得る。さらに、ジアザボリン誘導体がLPS生合成を阻害し(ラムラ(1987)(J.Antimicrob.Chemother.)20 37-45)、LPSは既知病原性因子であることから、本発明は、インビポで活性を強化したFAB Iが標的とされる抗菌性化合物を提供する。

#### 【0194】ワクチン

本発明の別の態様は、哺乳類において免疫応答を誘導する方法であって、哺乳類に抗体を産生させるのに十分なFAB Iまたはそのフラグメントまたは変種を接種することにより、前記動物を病気、特に細菌感染症、特にスタフィロコッカス感染症からまもることを含む方法に関するものである。本発明のさらに別の態様は、哺乳類において免疫応答を誘導する方法であって、遺伝子治療を通じて、FAB Iまたはそのフラグメントもしくは変種をコードする遺伝子を送達し、それによってインビポでFAB Iまたはそのフラグメントもしくは変種を発現させることにより、免疫応答を誘導して抗体を産生させ、前記動物を病気からまもることを含む方法に関するものである。

【0195】本発明のさらに別の態様は、哺乳類宿主に導入されると、その哺乳類において与えられたFAB Iまたはそこからコードされたタンパク質に対して免疫応答を誘導する免疫組成物であって、前記遺伝子またはそこからコードされたタンパク質の抗原をコードし、発現するDNAを含む組換えFAB Iまたはそこからコードされたタンパク質を含む組成物に関するものである。

【0196】FAB Iまたはそのフラグメントは、単独では抗体を産生し得ないが、第1タンパク質を安定化させ、免疫原性および防御特性を有する融合タンパク質を生成し得る共タンパク質と融合され得る。すなわち、融合組換えタンパク質は、好ましくはさらに抗原性共タンパク質、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)またはベータ-ガラクトシダーゼ、タンパク質を可溶化し、その製造および精製を容易にする比較的大きな共タンパク質を含む。さらに、共タンパク質は、免疫系の全身性刺激を与える意味でアジュバントとして作用し得る。共タンパク質は、第1タンパク質のアミノまたはカルボキシ末端に結合され得る。

【0197】FAB Iに対する免疫応答を強化する免疫刺激性DNA配列と一緒に本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを個体へ導入する方法、ならびにFAB Iおよび免疫刺激性DNA配列を含む組成物も、本発明に包含される。前記の免疫刺激性DNA配列およびそれらの用途は、サトウラ、(1996)「サイエンス」(Science)273:352に記載されている。

【0198】本発明はまた、免疫原性組換えタンパク質を適当な担体と一緒に含むワクチン製剤を包含する。タンパク質は胃で分解され得るため、好ましくは非経口投与(皮下、筋肉内、静脈内、皮内などの注射を含む)される。非経口投与に適した製剤には、抗酸化剤、緩衝液、防腐剤および製剤を受容者の血液と等張状態(isotonic)にする溶質を含み得る水性および非水性滅菌注射溶液、および懸濁剤または増粘剤を含み得る水性および非水性滅菌懸濁液がある。これらの製剤は、単位用量または多重用量容器、例えば密閉アンプルおよびガラス瓶に詰められ得、使用直前に滅菌液体担体を加えるだけでよい凍結乾燥状態で貯蔵され得る。ワクチン製剤はまた、製剤の免疫原性を強化するためのアジュバント系、例えば水中油系および当業界で公知の他の系を含み得る。用量はワクチンの比活性により異なり、常用的実験法により容易に決定され得る。

【0199】ある種のFAB Iに関して本発明の記載を行ったが、本発明は、組換えタンパク質の免疫原特性に実質的には影響しない付加、欠失および置換を伴う天然タンパク質のフラグメントおよび類似タンパク質(例えば、50%またはそれを越える配列相同性を有する)を包含するものと理解すべきである。

#### 【0200】組成物

本発明はまた、前記で検討されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドまたはアゴニストまたはアンタゴニストを含む組成物に関するものである。すなわち、本発明のポリペプチドは、細胞、組織または生物体の場合に使用される非滅菌または滅菌担体(複数も可)、例えば対象への投与に適した医薬用担体と組み合わせて使用され得る。前記組成物は、例えば媒質添加剤または治療有効量の本発明ポリペプチドおよび医薬的に許容し得る担体ま

たは賦形剤を含む。前記担体は、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセリン、エタノールおよびそれらの組み合わせを含み得るが、限定されるわけではない。製剤は投与方法に適合すべきである。

#### 【0201】キット

さらに本発明は、前述の本発明組成物の1種またはそれ以上の成分で充填された1つまたはそれ以上の容器を含む医薬パックおよびキットに関するものである。人体投与用製品の製造、使用または販売権限による承認を表す、医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を統制する政府機関により規定された形態での通告が、前記容器（複数も可）に添付され得る。

【0202】また、FAB I 指向性抗菌剤の直接治療を可能にするFAB I 遺伝子および相同体に関する診断用キットも本発明により提供される。Fab I および異なる種類からのFAB I の相同体を同定するためのDNAハイブリダイゼーションまたはタンパク質（モノクローナル抗体）に基づくキットも提供される。前記キットは、FAB I 遺伝子／タンパク質およびその相同体における突然変異を検出することができる。

#### 【0203】投与

本発明のポリペプチドおよび他の化合物は、単独または他の化合物、例えば治療用化合物と共に使用され得る。医薬組成物は、特に例えば局所、経口、肛門、膣、節脈内、腹膜内、筋肉内、皮下、鼻腔内または皮内経路による投与を含む、有効で好都合な方法により投与され得る。

【0204】医薬組成物は、一般に特定適応症（複数も可）の処置または予防に有効な量で投与される。一般に、組成物は、少なくとも約 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ （体重）の量で投与される。ほとんどの場合、それらは、1日に約 $8\text{mg}/\text{kg}$ （体重）を超えない量で投与される。好ましくは、ほとんどの場合、用量は、1日に約 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $1\text{mg}/\text{kg}$ （体重）である。最適用量は、適応症、その重症度、投与経路、悪化状態などを考慮して、各処置の機会および適応症に関する標準的方法により決定されるものとする。

【0205】治療において、または予防として、有効成分は、注射可能組成物として、例えば好ましくは等張性的滅菌水性分散液として個体に投与され得る。別法として、組成物は、局所適用、例えば軟膏、クリーム、ローション、眼用軟膏、点眼薬、点耳薬、口内洗浄剤、含浸ドレッシングおよび健合糸およびエーロゾルの形態で製剤化され得、例えば保存剤、薬剤浸透を促進する溶媒、および軟膏およびクリームにおける緩和薬を含む、適当な創用的添加剤を含み得る。前記局所製剤はまた、駆和性の創用的組体、例えばクリームまたは軟膏基剤、およびローション用のエタノールまたはオレイルアルコールを含み得る。前記担体は、製剤の重量にして約1%～約9.8%を相成し得る。さらに通常は、それらは製剤の約

80重量%以下を構成する。

【0206】人体に投与する場合、有効成分の1日用薬レベルは、 $0.01\sim 10\text{mg}/\text{kg}$ 、典型的には $1\text{mg}/\text{kg}$ 前後であることが予想される。いずれにしても医師が、個体に最適であり、特定個体の年齢、体重および応答により異なる実際の用量を決定する。前記用量は、平均症例の具体例である。勿論、これより高いかまたは低い用量範囲が妥当である個々の場合もあり得、それらも本発明の範囲内に含まれる。

10 【0207】内在デバイスには、外科的インプラント、補綴装置およびカテーテル、すなわち個体の体内に導入され、ある程度長期間その位置に残されるデバイスがある。かかるデバイスには、例えば人工関節、心臓弁、ペースメーカー、血管移植片、血管カテーテル、腎液シャント、泌尿器カテーテル、持続的外来腹膜透析（CAPD）カテーテルなどがある。

【0208】本発明の組成物は、内在デバイスの挿入直前に関連した細菌に対する全身効果を達成するため注射により投与され得る。手術後デバイスが体内にある間は20 処置が続行され得る。加えて、前記組成物を外科技術用の手術周囲カバーを広げての使用することにより、スタフィロコッカス外傷感染が阻止され得る。

【0209】多くの整形外科医は、補綴接合された個体の場合、歯血症を生じ得る歯科処置前に抗生素質予防について考えるべきであるとみなしている。晚期の深刻な感染は、補綴接合が失われることもある危険な合併症であり、重大な病的状態および死亡を伴う。従って、この状況で予防的抗生素質に代わるものとして活性成分の用途を拡大することが可能であり得る。

30 【0210】前記治療に加えて、本発明の組成物は、外傷組織で暴露されたマトリックスタンパク質への細菌接着を阻止するための外傷処置剤として、および抗生素質予防法に代わるものとしてまたはそれと共に歯科処置での予防用に一般に使用され得る。

【0211】別法として、本発明組成物は、挿入直前に留置装置を浸すのに使用され得る。活性成分は、好ましくは外傷または留置装置を浸す場合 $1\mu\text{g}/\text{ml}\sim 10\text{mg}/\text{ml}$ の濃度で存在する。ワクチン組成物は、好都合には注射可能形態である。創用的アジュバントは、免疫応答を強化するのに使用され得る。

【0212】予防接種に関する適当な単位用量は、 $0.5\sim 5\mu\text{g}/\text{kg}$ （抗原）であり、前記用量は好ましくは1～3回および1～3週間隔で投与される。指示された用量範囲では、本発明化合物の場合、適当な個体へのそれらの投与を阻む有害な毒性作用は全く観察されない。前記抗体はまた、FAB I タンパク質を含む細菌の存在を検出するための診断試薬として使用され得る。下記実施例を理解し易くするため、いくらかの類出の方法および/または語について記載する。

50 【0213】遺伝子治療

FAB I ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ポリペアチドであるアゴニストおよびアンタゴニストは、「遺伝子治療」と呼ばれることが多い処置様相において、インビポでの前記ポリペプチドの発現により本発明に従い使用され得る。本発明化合物は、遺伝子免疫療法として使用され、前記化合物が誘導された生物体および関連生物体に対して個体で免疫応答を発生させ得る。

【0214】すなわち、例えば、個体からの細胞は、ポリヌクレオチド、例えば生体外でポリペプチドをコードするDNAまたはRNAにより遺伝子工学処理に付され得、次いで工学処理された細胞は、ポリペプチドで処置される個体に提供され得る。例えば、細胞は、本発明ポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルス性プラスミドベクターの使用により生体外で遺伝子操作され得る。前記方法は当業界ではよく知られており、本発明におけるそれらの用途は、ここに示されている内容から明白である。

【0215】同様に、細胞は、当業界公知の方法によりインビポでポリペプチドを発現させるためインビポで遺伝子工学処理に付され得る。例えば、本発明のヌクレオチドは、前記で検討されている複製能欠損レトロウイルス性ベクターで発現させるように遺伝子操作され得る。次いで、レトロウイルス性発現構築物は単離され、本発明ポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルス性プラスミドベクターで形質転換されたパッケージング細胞へ導入され得ることによりパッケージング細胞は興味の対象である遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を生産する。これらの生産細胞は、個体へ投与されることによって、細胞をインビポで遺伝子工学処理に付し、ポリペプチドをインビポで発現させ得る。前記方法により本発明ポリペプチドを投与するためのこれらおよび他の投与方法は、本発明の開示内容から当業者には当然明白なものである。

【0216】前記のレトロウイルス性プラスミドベクターが誘導され得るレトロウイルスには、モロニーネズミ白血病ウイルス、脾臓癌死ウイルス、レトロウイルス、例えばラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、にわとり白血病ウイルス、てながざる白血病ウイルス、ひと免疫不全ウイルス、アデノウイルス、脊髄増殖性肉腫ウイルス、および乳房腫瘍ウイルスがあるが、これらに限定はされない。一具体例では、レトロウイルスプラスミドベクターは、モロニーネズミ白血病ウイルスから誘導される。

【0217】前記ベクターは、ポリペプチドを発現させるための1種またはそれ以上のプロモーターを含む。使用され得る適当なプロモーターには、レトロウイルスLTR、SV40プロモーター、およびミラーら、(1989)「バイオテクニクス」(Biotechniques) 7: 980-990に記載されたひとサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、または他のプロモーター(例、細

胞性プロモーター、例えば真核生物細胞プロモーター、例えばヒストン、RNAポリメラーゼIII、およびβ-アクチンプロモーター、ただしこれらに限定されない)があればそれらも含まれるが、これらに限定されるわけではない。使用され得る他のウイルス性プロモーターには、アデノウイルスプロモーター、チミジンキナーゼ(TK)プロモーターおよびB19バルボウイルスプロモーターがあるが、これらに限定されるわけではない。適当なプロモーターの選択は、ここに教示された内容から当業者にとっては明白なものである。

【0218】本発明ポリペプチドをコードする核酸配列は、適当なプロモーターの制御下におかれる。使用され得る適当なプロモーターには、アデノウイルスプロモーター、例えばアデノウイルス主要後期プロモーター、または異種プロモーター、例えばサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、RSVプロモーター、誘導性プロモーター、例えばMMTプロモーター、メタロチオネインプロモーター、熱ショックプロモーター、アルブミンプロモーター、APOA1プロモーター、ひとグロビンプロモーター、ウイルス性チミジンキナーゼプロモーター、例えば単純性疱疹チミジンキナーゼプロモーター、レトロウイルス性LTR(前記の修飾レトロウイルスLTRを含む)、β-アクチンプロモーター、およびひと成長ホルモンプロモーターがあるが、これらに限定されるわけではない。プロモーターはまた、ポリペプチドをコードする遺伝子を制御する天然プロモーターであり得る。

【0219】レトロウイルスプラスミドベクターを用いて、パッケージングセルラインに形質導入することにより、生産セルラインが形成される。トランسفェクションされ得るパッケージング細胞の例には、ミラー、A.P. (1990)「ヒューマン・ジーン・セラピー」(Human Gene Therapy) 1: 5-14に記載されたE50

1、PA317、Y-2、Y-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、YCRE、YCRIP、GP+E-86、GP+envAm12およびDANセルラインがあるが、これらに限定されるわけではない。ベクターは、当業界公知の手段によりパッケージング細胞中へ形質導入され得る。前記手段には、エレクトロポレーション、リボソームの使用およびCaPO<sub>4</sub>沈澱があるが、これらに限定はされない。別法では、レトロウイルスプラスミドベクターは、リボソーム中に封入されるか、または脂質に結合され、次いで宿主に投与され得る。

【0220】生産セルラインは、感染性レトロウイルスベクター粒子を生産し、それらはポリペプチドをコードする核酸配列(複数も可)を含んでいる。次いで、前記のレトロウイルスベクターは、インビポまたはインビポで、真核生物細胞の形質導入に使用され得る。形質導入された真核細胞は、ポリペプチドをコードする核酸配

列（複数も可）を発現する。形質導入され得る真核細胞には、胚芽幹細胞、胚芽癌腫細胞並びに造血幹細胞、肝細胞、線維芽細胞、筋芽細胞、ケラチン生成細胞、内皮細胞および気管支上皮細胞があるが、これらに限定されるわけではない。

## 【0221】

【実施例】以下、実施例によりさらに詳しく本発明の記載を行う。与えられた実施例は、特定具体例を挙げて本発明を説明しているに過ぎない。これらの実例は、本発明の若干の実施態様を説明しており、開示された発明の範囲の限定を表したり、限界を示すものではない。

【0222】ここで使用されている若干の語については、前記用語解説で説明されている。実施例は全て、特に詳述されていない場合は、当業者には公知かつ常用的な標準技術を用いて行われた。下記実施例の常用的分子生物学的技術は、標準的実験マニュアル、例えばサムブルックら、(1989)「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリ・マニュアル」(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、コールドスプリングハーバー・ラボラトリ・プレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク)の記載に従い実施され得る。

【0223】下記実施例に示された部または量は全て、特記されていない限り、重量によるものである。特記されていない限り、下記実施例におけるフラグメントのサイズ分離は、サムブルックら、(1989)「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリ・マニュアル」(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、コールドスプリングハーバー・ラボラトリ・プレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク)および多くの他の参考文献、例えばゲッタルらによる、(1980)「ヌクレオイック・アシズ・リサーチ」(Nucleic Acids Res.)8:4057におけるアガロースおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動(「PAGE」)の標準的技術を用いて行われた。

【0224】特記されていない限り、ライゲーションは、標準的な緩衝液、インキュベーション温度および時間、ほぼ当モル量のライゲーションされるDNAフラグメントおよび0.5 $\mu$ gのDNAにつき約10単位のT4 DNAリガーゼ(「リガーゼ」)を用いて行われた。

## 【0225】実施例1

スタフィロコッカス・アウレウス(S.aureus) FAB I 遺伝子の単離および配列決定

配列番号1で与えられたDNA配列を有するポリヌクレオチドは、エシェリヒア・コリ(E.coli)におけるスタフィロコッカス・アウレウス(S.aureus)WC UH 29の染色体DNAのクローンのライブラリーの配列決定から得られた。ここに記載された方法により、それは、マウス感染モデルでのスタフィロコッカス・アウレウス(S.aur

eus)WC UH 29の確立した感染においてインビボで転写されることが立証された。

【0226】配列番号1で与えられたDNA配列を用いてFAB I タンパク質をコードするポリヌクレオチドを得るため、一般的にはエシェリヒア・コリ(E.coli)または他の適当な宿主におけるスタフィロコッカス・アウレウス(S.aureus)WC UH 29の染色体DNAのクローンのライブラリーを、部分配列から誘導された放射性標識オリゴヌクレオチド、好ましくは17量体またはそれ

- 10 より長いものでプローブする。次に、プローブと同一のDNAをもつクローンは、高ストリンジェンシー洗浄液を用いて識別され得る。原配列から設計された配列決定プライマーによりこうして同定された個々のクローンを配列決定することにより、次に、両方向に配列を伸ばして、完全な遺伝子配列を決定することが可能である。好都合には、前記配列決定は、プラスミドクローンから製造された変性2本鎖DNAを用いて行われる。適当な技術は、マニアチス、T.、フリッチ、E.F.およびサムブルックら、(1989)「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリ・マニュアル」(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、コールドスプリングハーバー・ラボラトリ・プレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク)に記載されている。(ハイブリダイゼーションによるスクリーニング1.90および変性2本鎖DNA模型の配列決定13.70参照)。
- 20 【0227】場合によっては、重複するスタフィロコッカス・アウレウス(S.aureus)WC UH 29 DNAを含む2つまたはそれ以上のクローンから得られた配列決定データを用いることにより、配列番号1における近接DNA配列を構築した。ライブラリーは、常用的方法、例えば方法1および2により製造され得る。全細胞DNAは、標準的方法に従いスタフィロコッカス・アウレウス(S.aureus)株WC UH 29 (NC I M B 40771)から単離され、2方法のいずれかによりサイズ分画される。

## 【0228】方法1

- 全細胞DNAを針を通して機械的に剪断することにより、標準方法に従ってサイズ分画する。エキソヌクレアーゼおよびDNAポリメラーゼで処理することにより大きさ11kb以下DNAフラグメントを平滑にし、EcoRIリンカーを加える。EcoRIで切断されたベクターラムダZap IIへフラグメントをライゲーションし、ライブラリーを標準的方法によりパッケージし、パッケージされたライブラリーでエシェリヒア・コリ(E.coli)を感染させる。ライブラリーを標準的方法により増幅する。

## 【0229】方法2

- 全細胞DNAを4種の制限酵素(RsaI、PstI、AluIおよびBsh1235I)の組み合わせにより部分的に加水分解し、標準的方法に従いサイズ分画す

る。EcoRI リンカーをDNAにライゲーションし、次いでフラグメントをEcoRIで切断されたベクターラムダZapIIにライゲーションし、ライブラリーを標準的方法によりパッケージし、パッケージされたライブラリーでエシメリヒア・コリ(E.coli)を感染させる。ライブラリーを標準的方法により増幅する。

#### 【0230】実施例2

##### FAB I 酶素活性分析

FAB Iタンパク質の活性は、基質としてクロトノイール-C<sub>0</sub>Aまたはクロトノイル-ACPを用い(バーグラーら、(1994)、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」(J.Biol.Chem.) 269, 5493-5496)、NADHの消費による340 nmでの吸光度の減少をモニターすることにより測定され得る。クロトノイル-ACP (K<sub>m</sub> 22 μM)の方が、クロトノイル-C<sub>0</sub>A (K<sub>m</sub> 2.7 mM)よりも優れた基質であり、クロトノイル-C<sub>0</sub>Aはシグマから入手可能である(C6146)。ジアザボリン誘導体は、陽性対照として使用され得、これは、当業界公知の方法を用いて市販されている出発材料による2段階合成により当然容易に入手される。試験化合物をこの検定に加えることにより、それらが酵素活性を活性化するかそれに拮抗するかが測定され得る。

#### 【0231】実施例3

##### スタフィロコッカス・アウレウス(S.aureus) FAB I の遺伝子免疫療法的発現

雄芽細胞を皮膚生検により対象から入手する。生成した組織を組織培養培地に入れ、小片に分離する。組織の小片を組織培養フラスコの湿った表面に置き、約10片を各フラスコに入れる。フラスコを逆さにし、堅く閉め、室温で一夜放置する。室温で24時間後、フラスコを底位させ、組織片をフラスコの底に固定させ、新鮮な培地(例、ハムのF12培地、10%FBS、ペニシリントリプトマイシン含有)を加える。次いで、組織を約1週間37°Cでインキュベーションする。この時点で、新鮮な培地を加え、ひき続いて数日毎に交換する。さらに2週間培養後、単層の雄芽細胞が現れる。単層をトリプシン処理し、大きなフラスコへ剥して入れる。

【0232】遺伝子療法用ベクターを、発現されるフラグメントをクローニングするため制限酵素で消化する。消化されたベクターを、牛脳ホスファターゼで処理することにより、自己ライゲーションを阻止する。脱リン酸化された線形ベクターをアガロースゲルで分画し、精製する。

【0233】活性FAB Iを発現し得るFAB I DNAを単離する。ベクターへクローニングするためフラグメントの端部を必要ならば修飾する。例えば、5'突出部をDNAポリメラーゼで処理することにより、平滑末端が作製され得る。3'突出部は、S1ヌクレアーゼ

を用いて除去され得る。リンカーは、T4 DNAリガーゼにより平滑末端へライゲーションされ得る。

【0234】等量のモロニーねずみ白血病ウイルス線形バックボーンおよびFAB I フラグメントと一緒に混合し、T4 DNAリガーゼを用いて連結する。ライゲーション混合物を用いてエシメリヒア・コリを形質転換し、次いで、細菌をカナマイシン含有寒天に置く。カナマイシン表現型および制限分析により、ベクターが適切に挿入された遺伝子を有することを確認する。

【0235】パッケージング細胞を、10%牛血清(CS)、ペニシリントリプトマイシン含有ダルベッコ修飾イグルズ培地(DMEM)において組織培養で全面密度に生長させる。FAB I 遺伝子含有ベクターを、標準技術によりパッケージング細胞へ導入する。FAB I 遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を、現在生産細胞と呼んでいるパッケージング細胞から集める。

【0236】新鮮な培地を生産細胞に加え、適当なインキュベーション期間後、全面生長生産細胞のプレートから培地を採取する。感染性ウイルス粒子を含む培地をミルボアフィルターにより沪過し、脱離した生産細胞を除去する。次いで、沪過された培地を用いて、雄芽細胞を感染させる。培地を雄芽細胞の半全面生長プレートから除去し、迅速に沪過された培地を後に入れる。形質導入を促進するため、ポリブレン(アルドリッチ)が培地に含まれ得る。適当なインキュベーション後、培地を除去し、新鮮な培地を後に入れる。ウイルス力値が高い場合、事実上全ての雄芽細胞が感染され、選択は必要とされない。力値が低い場合、拡大用に形質導入細胞を選択するための選択可能なマーカー、例えばneoまたはhisを有するレトロウイルスベクターの使用が必要である。

【0237】次いで、遺伝子操作された雄芽細胞は、単独または微小担体ビーズ、サイトデックス3ビーズで全面生長後、ラットに注射され得る。注射された雄芽細胞は、FAB I 産物を生産し、タンパク質の生物学的作用が宿主に伝達される。本発明が、前記の記載および実施例で特に記載された方法以外でも実践され得ることは明白である。前記で教示した内容から本発明の多くの修飾および変形が可能であり、従ってそれらも後記請求の範囲内に含まれる。

#### 【0238】

##### 【配列表】

###### (1) 一般情報

- (1) 出願人: ロンズデイル, ジョン  
ミルナー, ピーター  
ペイン, ディビッド  
ピアソン, スチュワート
- (i i ) 発明の名称: 新規Fab I
- (i i i ) 配列の数: 2
- (i v ) 連絡先住所:

57

(A) 名宛人： スミスクライン・ビーチャム・コーポ  
レーション  
(B) 街： 709 スウェーデランド・ロード  
(C) 市： キング・オブ・プロシア  
(D) 州： ペンシルベニア  
(E) 国： アメリカ合衆国  
(F) 郵便番号： 19406-0939  
(v) コンピューター読み取り可能フォーム：  
(A) 媒介タイプ： ディスクケット  
(B) コンピューター： IBM互換性  
(C) オペレーティングシステム： DOS  
(D) ソフトウェア： ファーストSEQ、ウインドウズ  
・バージョン2.0用  
(v i) 現出願データ：  
(A) 出願番号  
(B) 出願日： 1997年8月28日  
(C) 分類：  
(v i i) 先行出願データ：

\* (A) 出願番号： 60/024845  
(B) 出願日： 1996年8月28日  
(v i i i) 代理人／代行者情報：  
(A) 名前： ジミィ、エドワード R  
(B) 登録番号： 38891  
(C) 照会／証明番号： GM50005  
(i x) テレコミュニケーション情報：  
(A) 電話： 610-270-4478  
(B) テレファックス： 610-270-5090  
10 (C) テレックス：  
【0239】(2)配列番号1に関する情報：  
(i) 配列特性：  
(A) 長さ： 256アミノ酸  
(B) タイプ： アミノ酸  
(C) 鎮の数： 1本  
(D) トポロジー： 線形  
(i i) 分子タイプ： タンパク質

\*

(x i) 配列の記載： 配列番号1：  
 Met Leu Asn Leu Glu Asn Lys Thr Tyr Val Ile Met Gly Ile Ala Asn  
 1 5 10 15  
 Lys Arg Ser Ile Ala Phe Gly Val Ala Lys Val Leu Asp Gln Leu Gly  
 20 25 30  
 Ala Lys Leu Val Phe Thr Tyr Arg Lys Glu Arg Ser Arg Lys Glu Leu  
 35 40 45  
 Glu Lys Leu Leu Glu Gln Leu Asn Gln Pro Glu Ala His Leu Tyr Gln  
 50 55 60  
 Ile Asp Val Gln Ser Asp Glu Glu Val Ile Asn Gly Phe Glu Gln Ile  
 65 70 75 80  
 Gly Lys Asp Val Gly Asn Ile Asp Gly Val Tyr His Ser Ile Ala Phe  
 85 90 95  
 Ala Asn Met Glu Asp Leu Arg Gly Arg Phe Ser Glu Thr Ser Arg Glu  
 100 105 110  
 Gly Phe Leu Leu Ala Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Val  
 115 120 125  
 Ala His Glu Ala Lys Lys Leu Met Pro Glu Gly Gly Ser Ile Val Ala  
 130 135 140  
 Thr Thr Tyr Leu Gly Gly Glu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Asn Val Met  
 145 150 155 160  
 Gly Val Ala Lys Ala Ser Leu Glu Ala Asn Val Lys Tyr Leu Ala Leu  
 165 170 175  
 Asp Leu Gly Pro Asp Asn Ile Arg Val Asn Ala Ile Ser Ala Gly Pro  
 180 185 190  
 Ile Arg Thr Leu Ser Ala Lys Gly Val Gly Gly Phe Asn Thr Ile Leu  
 195 200 205  
 Lys Glu Ile Glu Glu Arg Ala Pro Leu Lys Arg Asn Val Asp Gln Val  
 210 215 220  
 Glu Val Gly Lys Thr Ala Ala Tyr Leu Leu Ser Asp Leu Ser Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Val Thr Gly Glu Asn Ile His Val Asp Ser Gly Phe His Ala Ile Lys

245

250

60

【0240】(2)配列番号2に関する情報:

(i)配列特性:

(A)長さ: 771塩基対

(B)タイプ: 核酸

\*(C)鎖の数: 2本

(D)トポロジー: 線形

(ii)分子タイプ: ゲノムDNA

\*

(xi)配列の記載: 配列番号2:

ATGTTAAATC TTGAAAACAA AACATATGTC ATCATGGAA TGCTAATAA GCGTAGTATT	60
GCTTTGGTG TCGCTAAAGT TTTAGATCAA TTAGGTGCTA AATTAGTATT TACTTACCGT	120
AAAGAAOGTA GCCGTAAGA GCTTGAAAAA TTATTAGAAC AATTAAATCA ACCAGAAGOG	180
CACTTATATC AAATTGATGT TCAAAGCGAT GAAGAGGTTA TTAATGGTT TGAGCAAATT	240
GGTAAAGATG TTGGCAATAT TGATGGTGTAT TATCATTCAA TCGCATTGCT TAATATGGAA	300
GACTTAOGCG GACGCTTTTC TGAAACATTCA CGTGAAGGCT TCTTGTGTC TCAAGACATT	360
AGTTCTTACT CATTAAACAAT TGTGGCTCAT GAAGCTAAAA AATTAATGCC AGAAGGTGGT	420
AGCATTGTTG CAACAACATA TTTAGGTGGC GAATTOGCAG TTCAAAATTAA TAATGTGATG	480
GGTGGTGGCTA AAGCGAGCTT AGAAGCAAAT GTAAATATT TAGCATTAGA CTTAGGTCCCT	540
GATAATATTG CGCTTAATGC AATTCAGCT GGTOCAATCC GTACATTAAG TGCAAAAGGT	600
GTGGGTGGTT TCAATACAAT TCTTAAAGAA ATCGAAGAGC GTGCACCTTT AAAACGTAAC	660
GTTGATCAAG TAGAAGTAGG TAAAACAGCG GCTTACTTRT TAAGTGACTT ATCAAGTGGC	720
GTTACAGGTG AAAATATTCA TGTAGATAGC GGATTCACG CAATTAATAA A	771

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 図2【配列番号1】のポリヌクレオチドから誘導されたスタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)FAB-Iのポリヌクレオチド配列を示す(配列番号1)。

## ※号2).

【図2】 スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)FAB-Iのポリヌクレオチド配列を示す(配列番号1)。

## 【図1】

## 【配列番号2】

1	MILNLENKTYV IMGIANKRSI AFGVAKVLDQ LGAKLVFTYR KERSRKELEK
51	LLEQLNQPEA HLYQIDVQSD EKVINGFEQI GKDVGNIDGV YHSIAFANME
101	DLRGGRPSETS REGFLLAQDI SSYSLTIVAH EAKKLMPEGG SIVATTYLGG
151	EFAVQNYNVM GVAKASLEAN VKYLALDLGP DNIRVNAISA GPIRTLSAKG
201	VGGFNTILKR IEERAPLKRN VDQVEVGKTA AYLLSDLSSG VTGENIHVDS
251	GFHAIK

## 【図2】

## [配列番号1]

1 ATGTTAAATC TTGAAACAA AACATATGTC ATCATGGGAA TCGCTAATAA  
 51 GCGTAGTATT GCTTTGGTG TCGCTAAAGT TTTAGATCAA TTAGGTGCTA  
 101 AATTAGTATT TACTTACCGT AAAGAACGTA GCCGTAAAGA GCTTGAAAAA  
 151 TTATTAGAAC AATTAAATCA ACCAGAACGCG CACTTATATC AAATTGATGT  
 201 TCAAAGCGAT GAAGAGGITA TTAATGGTT TGAGCAAATT GGTAAAGATG  
 251 TTGGCAATAT TGATGGTGT A TATCATTCAA TCGCATTGTC TAATATGGAA  
 301 GACTTACGCG GACGCTTTTC TGAAACATTCA CGTGAAGGCT TCTTGTAGC  
 351 TCAAGACATT AGTTCTTACT CATTACAAT TGTGGCTCAT GAAGCTAAA  
 401 AATTAATGCC AGAAGGTGGT AGCATTGTTG CAACAACATA TTTAGGTGGC  
 451 GAATTTCGCAG TTCAAAATTA TAATGTGATG GGTGTTGCTA AAGCGAGCTT  
 501 AGAAGCAAAT GTTAAATATT TAGCATTAGA CTTAGGTCCCT GATAATATTC  
 551 GCGTTAATGC AATTTCAGCT GGTCCAATCC GTACATTAAG TGCAAAAGGT  
 601 GTGGGTGGTT TCAATACAAT TCTTAAAGAA ATCGAAGAGC GTGCACCTTT  
 651 AAAACGTAAC GTTGATCAAG TAGAAGTAGG TAAAACAGCG GCTTACTTRT  
 701 TAAGTGACTT ATCAAGTGGC GTTACAGGTG AAAATATTCA TGTAGATAGC  
 751 GGATTCCACG CAATTAATA A

## フロントページの焼き

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号  
 C 1 2 N 9/02  
 G 0 1 N 33/53  
 // (C 1 2 N 15/09 ZNA  
 C 1 2 R 1:445)

F I  
 G 0 1 N 33/53 D  
 A 6 1 K 37/50 ABD

(72) 発明者 ピーター・ヘンリー・ミルナー  
 イギリス、シーエム6・2エイジー、エセ  
 ックス、グレイト・ダンモー、エンブレム  
 ズ27番

(72) 発明者 デイビッド・ジョン・ペイン  
 アメリカ合衆国19460ペンシルベニア州フ  
 ェニックスビル、ウォーターフォール・ウ  
 ェイ618番  
 (72) 発明者 スチュワート・キャンベル・ペアソン  
 アメリカ合衆国19312ペンシルベニア州バ  
 ーウィン、ハイポイント・ドライブ72番

## 〔外国語明細書〕

## FAB II

This invention relates, in part, to newly identified polynucleotides and polypeptides; variants and derivatives of these polynucleotides and polypeptides; processes for making these polynucleotides and these polypeptides, and their variants and derivatives; agonists and antagonists of the polypeptides; and uses of these polynucleotides, polypeptides, variants, derivatives, agonists and antagonists. In particular, in these and in other regards, the invention relates to polynucleotides and polypeptides of staphylococcal Fab I enoyl-ACP reductase, hereinafter referred to as 'FAB I'.

## BACKGROUND OF THE INVENTION

Although the overall pathway of saturated fatty acid biosynthesis is similar in all organisms, the fatty acid synthase (FAS) systems vary considerably with respect to their structural organization. Thus in Type I FAS systems, found in vertebrates and yeasts, the necessary enzymes required for fatty acid synthesis are present on one or two polypeptide chains respectively. In contrast, in Type II systems found in most bacteria and plants, each step in the pathway is catalyzed by a separate mono-functional enzyme. It would therefore appear that significant selectivity of inhibition of the bacterial and mammalian enzymes is possible.

Fab I (previously designated EnvM) functions as an enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase (Bergler, et al. (1994), *J.Biol.Chem.* 269, 5493-5496) in the final step of the four reactions involved in each cycle of bacterial fatty acid biosynthesis.

The first step is catalysed by  $\beta$ -ketoseryl-ACP synthase, which condenses malonyl-ACP with acetyl-CoA (FabH, synthase III). In subsequent rounds malonyl-ACP is condensed with the growing-chain acyl-ACP (FabB and FabF, synthases I and II respectively).

The second step in the elongation cycle is ketoester reduction by NADPH-dependent  $\beta$ -ketoseryl-ACP reductase (FabG). Subsequent dehydration by  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP dehydrase (either FabA or FabZ) leads to trans-2-enoyl-ACP which is in turn converted to acyl-ACP by NADH-dependent enoyl-ACP reductase (Fab I). Further rounds of this cycle, adding two carbon atoms per cycle, eventually lead to palmitoyl-ACP (16C) whereupon the cycle is stopped largely due to feedback inhibition of Fab I by palmitoyl-ACP (Heath, et al. (1996), *J.Biol.Chem.* 271, 1833-1836). Fab I is therefore a major biosynthetic enzyme which is also a key regulatory point in the overall synthetic pathway.

Early data suggested that there were two enoyl-ACP reductases in *E.coli*, one NADPH dependent and the other NADH dependent. However, more recent work has found no evidence for the NADPH dependent enzyme and Fab I is the only enoyl ACP reductase

登録番号 156216

identified in *E.coli*. (Heinh, et al, (1995), *J.Biol.Chem.* 270, 26538 - 26542; Bergler, et al, (1994), *J.Biol.Chem.* 269, 5493-5496).

It has been shown that diazaborine antibiotics inhibit fatty acid, phospholipid and lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis and it has also been shown that the antibacterial target of these compounds is Fab I. For example derivative 2b18 from Grasberger, et al (1984) *J. Med Chem* 27 947-953 has been shown to be a non-competitive inhibitor of Fab I having a  $K_i = 0.2\text{mM}$  (Bergler, et al. (1994), *J.Biol.Chem.* 269, 5493-5496). The antibacterial activity of diazaborine derivatives against Gram-negatives and Gram positive organisms is well documented (Grasberger et al., *J. Med Chem.* 1984 27, 947-953; Grunowitz et al., *Acta Pharm Suecica*, 1971 8 377; Wersch et al U.S. Patent, 2,533,918; Lam et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 1987 20 37-45).

Conditionally lethal Fab I mutants have been constructed in *E.coli* and the *Fab I* gene from *Salmonella typhimurium* complements this mutation. In addition, plasmids containing the *Fab I* gene from diazaborine resistant *S. typhimurium* conferred diazaborine resistance in *E.coli* (Turnowsky, et al, (1989), *J.Bacteriol.*, 171, 6555-6565) confirming Fab I as the antibacterial target of diazaborines.

Inhibition of Fab I either by diazaborine or by raising the temperature in an *Fab I* temperature sensitive mutant to non-permissive conditions is lethal, thus demonstrating that Fab I is essential to the survival of the organism (Bergler, et al, (1994), *J.Biol.Chem.* 269, 5493-5496). Laboratory generated point mutations in the *Fab I* gene lead to diazaborine resistant *E.coli*.

登録番号 156216

Fab I is conserved in Gram negative organisms with 98% identity between *E.coli* and *S.typhimurium* Fab I (Bergler, et al., (1992), *J.Gen.Microbiol.* 138, 2093-2100) and 75% identity between these proteins and *H.influenzae* Fab I. *Staphylococcus aureus* FAB I of the invention shows 54% similarity to the mycobacterial protein, InhA, which is highly conserved throughout mycobacteria including *M.tuberculosis*. *E.coli* Fab I was found to be 34% identical, 57% similar to *Brassica napus* (rape seed) enoyl-ACP reductase and *S.aureus* FAB I of the present invention was also 34% identical, 57% similar. Moreover, FAB I of the present invention was found to be 44% identical, 64% similar over 252 amino acids to *E.coli* Fab I. FAB I of the present invention is only 27% identical, 48% similar to a mammalian 2,4-dienoyl-coenzyme A reductase. This mammalian homolog differs from FAB I in that it is involved in the β-oxidation of polyunsaturated enoyl-CoAs and utilizes NADPH as cofactor rather than NADH. Therefore, there is significant potential for selective inhibition of FAB I. Since there are no marketed antibiotics targeted against fatty acid biosynthesis it is likely that inhibitors of FAB I will not be susceptible to current antibiotic resistance mechanisms. Moreover, this is a potentially broad spectrum target.

There is an unmet need for developing new classes of antibiotic compounds. Clearly, there is also a need for factors, such as FAB I, that may be used to screen compounds for antibiotic activity, such as a simple high through-put assay for screening inhibitors of FAS. Such factors may also be used to determine their roles in pathogenesis of infection, dysfunction and disease. Identification and characterization of such factors, which can play a role in preventing, ameliorating or correcting infections, dysfunctions or diseases are critical steps in making important discoveries to improve human health.

## SUMMARY OF THIS INVENTION

Toward these ends, and others, it is an object of the present invention to provide polypeptides, *inter alia*, that have been identified as novel FAB I by homology between the amino acid sequence set out in Figure 1 [SEQ ID NO:2] and known amino acid sequences of other proteins such as *E.coli* FabI enoyl-ACP reductase and those aforementioned.

It is a further object of the invention, moreover, to provide polynucleotides that encode FAB I, particularly polynucleotides that encode the polypeptide herein designated FAB I.

In a particularly preferred embodiment of this aspect of the invention the polynucleotide comprises the region encoding FAB I in the sequence set out in Figure 1 [SEQ ID NO:2].

登録番号 156216

In another particularly preferred embodiment of the present invention there is a novel FAB I protein from *S. aureus* WCUH 29 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a fragment, analogue or derivative thereof.

5 In accordance with this aspect of the invention there is provided an isolated nucleic acid molecule encoding a mature polypeptide expressible by the *Staphylococcus aureus* WCUH 29 strain contained in NCIMB Deposit No. 40771.

10 In accordance with this aspect of the invention there are provided isolated nucleic acid molecules encoding FAB I, particularly staphylococcal FAB I, including mRNAs, cDNAs, genomic DNAs and, in further embodiments of this aspect of the invention, biologically, diagnostically, clinically or therapeutically useful variants, analogs or derivatives thereof, or fragments thereof, including fragments of the variants, analogs and derivatives.

Among the particularly preferred embodiments of this aspect of the invention are naturally occurring allelic variants of FAB I.

15 In accordance with this aspect of the invention there are provided novel polypeptides of staphylococcal origin referred to herein as FAB I as well as biologically, diagnostically or therapeutically useful fragments, variants and derivatives thereof, variants and derivatives of the fragments, and analogs of the foregoing.

It also is an object of the invention to provide FAB I polypeptides, particularly FAB I polypeptides, that may be employed for therapeutic purposes, for example, to treat disease, 20 including treatment by conferring host immunity against infections, such as staphylococcal infections including, but not limited to infections of upper respiratory tract (e.g. otitis media, bacterial tracheitis, acute epiglottitis, thyroiditis), lower respiratory (e.g. empyema, lung abscess), cardiac (e.g. infective endocarditis), gastrointestinal (e.g. secretory diarrhoea, splenic abscess, retroperitoneal abscess), CNS (e.g. cerebral abscess), eye (e.g. blepharitis, conjunctivitis, keratitis, endophthalmitis, preseptal and orbital cellulitis, dacryocystitis), kidney and urinary tract (e.g. epididymitis, intrarenal and perinephric abscess, toxic shock syndrome), skin (e.g. impetigo, folliculitis, cutaneous abscesses, cellulitis, wound infection, bacterial myositis), and bone and joint (e.g. septic arthritis, osteomyelitis).

30 In accordance with yet a further aspect of the present invention, there is provided the use of a polypeptide of the invention for therapeutic or prophylactic purposes, for example, as an antibacterial agent or a vaccine.

登録番号 156216

In accordance with another aspect of the present invention, there is provided the use of a polynucleotide of the invention for therapeutic or prophylactic purposes, in particular genetic immunization.

Among the particularly preferred embodiments of this aspect of the invention are variants 5 of FAB I polypeptides encoded by naturally occurring alleles of the FAB I gene.

It is another object of the invention to provide a process for producing the aforementioned polypeptides, polypeptide fragments, variants and derivatives, fragments of the variants and derivatives, and analogs of the foregoing.

In a preferred embodiment of this aspect of the invention there are provided methods for 10 producing the aforementioned FAB I polypeptides comprising culturing host cells having expressibly incorporated therein an exogenously-derived FAB I-encoding polynucleotide under conditions for expression of FAB I in the host and then recovering the expressed polypeptide.

In accordance with another object the invention there are provided products, compositions, processes and methods that utilize the aforementioned polypeptides and polynucleotides for 15 research, biological, clinical and therapeutic purposes, *inter alia*.

In accordance with yet another aspect of the present invention, there are provided inhibitors to such polypeptides, useful as antibacterial agents. In particular, there are provided antibodies against such polypeptides.

In accordance with certain preferred embodiments of this aspect of the invention, there are 20 provided products, compositions and methods, *inter alia*, for, among other things: assessing FAB I expression in cells by detecting FAB I polypeptides or FAB I-encoding mRNA; to treat bacterial infections *in vitro*, *ex vivo* or *in vivo* by exposing cells to FAB I polypeptides or polynucleotides as disclosed herein; assaying genetic variation and aberrations, such as defects, in FAB I genes; and administering a FAB I polypeptide or polynucleotide to an organism to raise an immunological 25 response against bacteria, such as, for example a staphylococcus.

In accordance with certain preferred embodiments of this and other aspects of the invention there are probes that hybridize to FAB I sequences.

In certain additional preferred embodiments of this aspect of the invention there are 30 provided antibodies against FAB I polypeptides. In certain particularly preferred embodiments in this regard, the antibodies are highly selective for FAB I.

In accordance with another aspect of the present invention, there are provided FAB I agonists. Among preferred agonists are molecules that mimic FAB I, that bind to FAB I-binding molecules or binding molecules, and that elicit or augment FAB I-induced responses. Also among

整理番号 156216

preferred agonists are molecules that interact with FAB I, or with other modulators of FAB I activities, and thereby potentiate or augment an effect of FAB I or more than one effect of FAB I and are bacteriostatic or bacteriocidal.

In accordance with yet another aspect of the present invention, there are provided FAB I antagonists. Among preferred antagonists are those which mimic FAB I so as to bind to FAB I-binding molecules but not elicit a FAB I-induced response or more than one FAB I-induced response. Also among preferred antagonists are molecules that bind to or interact with FAB I so as to inhibit an effect of FAB I or more than one effect of FAB I or which prevent expression of FAB I. Further particularly preferred antagonists of FAB I lower or abolish a FAB I enzymatic activity or activities.

In a further aspect of the invention there are provided compositions comprising a FAB I polynucleotide or a FAB I polypeptide for administration to cells *in vitro*, to cells *ex vivo* and to cells *in vivo*, or to a multicellular organism. In certain particularly preferred embodiments of this aspect of the invention, the compositions comprise a FAB I polynucleotide for expression of a FAB I polypeptide in a host organism to raise an immunological response, preferably to raise immunity in such host against bacteria, preferably staphylococci or closely genetically related organisms.

Other objects, features, advantages and aspects of the present invention will become apparent to those of skill from the following description. It should be understood, however, that the following description and the specific examples, while indicating preferred embodiments of the invention, are given by way of illustration only. Various changes and modifications within the spirit and scope of the disclosed invention will become readily apparent to those skilled in the art from reading the following description and from reading the other parts of the present disclosure.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The following drawing depicts certain embodiments of the invention. It is illustrative only and does not limit the invention otherwise disclosed herein.

Figure 1 [SEQ ID NO:2] shows the polypeptide of *Staphylococcus aureus* FAB I deduced from the polynucleotide of Figure 2 [SEQ ID NO:1].

Figure 2 [SEQ ID NO:1] shows the polynucleotide sequence of *Staphylococcus aureus* FAB I.

#### 30 GLOSSARY

The following illustrative explanations are provided to facilitate understanding of certain terms used frequently herein, particularly in the Examples. The explanations are provided as a convenience and are not limitative of the invention.

登録番号 156216

BINDING MOLECULE, as used herein, refers to molecules or ions which bind or interact specifically with FAB I polypeptides or polynucleotides of the present invention, including, for example enzyme substrates and substrate and co-factor mimetics, as well as classical receptors (which also may be referred to as "binding molecules" and "interaction molecules," respectively and as "FAB I binding molecules" and "FAB I interaction molecules"). Binding between polypeptides of the invention and such molecules, including binding or binding or interaction molecules may be exclusive to polypeptides of the invention, which is very highly preferred, or it may be highly specific for polypeptides of the invention, which is highly preferred, or it may be highly specific to a group of proteins that includes polypeptides of the invention, which is preferred, or it may be specific to several groups of proteins at least one of which includes a polypeptide of the invention.

Binding molecules also may be non-naturally occurring, such as antibodies and antibody-derived reagents that bind specifically to polypeptides of the invention.

DIGESTION of DNA refers to cleavage of DNA with a restriction enzyme that acts only at certain sequences in the DNA. The various restriction enzymes referred to herein are commercially available and their reaction conditions, cofactors and other requirements for use are well known and routine to the skilled artisan.

For analytical purposes, typically, 1 µg of plasmid or DNA fragment is digested with about 2 units of enzyme in about 20 µl of reaction buffer. For the purpose of isolating DNA fragments for plasmid construction, typically 5 to 50 µg of DNA are digested with 20 to 250 units of enzyme in proportionately larger volumes.

Appropriate buffers and substrate amounts for particular restriction enzymes are described in standard laboratory manuals, such as those referenced below, and they are specified by commercial suppliers.

Incubation times of about 1 hour at 37°C are ordinarily used, but conditions may vary in accordance with standard procedures, the supplier's instructions and the particulars of the reaction. After digestion, reactions may be analyzed, and fragments may be purified by electrophoresis through an agarose or polyacrylamide gel, using well known methods that are routine for those skilled in the art.

GENETIC ELEMENT generally means a polynucleotide comprising a region that encodes a polypeptide or a region that regulates transcription or translation or other processes important to expression of the polypeptide in a host cell, or a polynucleotide comprising both a region that encodes a polypeptide and a region operably linked thereto that regulates expression.

登録番号 156216

Genetic elements may be comprised within a vector that replicates as an episomal element; that is, as a molecule physically independent of the host cell genome. They may be comprised within plasmids. Genetic elements also may be comprised within a host cell genome; not in their natural state but, rather, following manipulation such as isolation, cloning and introduction into a host cell in the form of purified DNA or in a vector, among others.

HOST CELL is a cell which has been transformed, transfected, infected, or entered by an exogenous polynucleotide sequence, or is capable of transformation, infection, transfection, or entry by an exogenous polynucleotide sequence.

IDENTITY or SIMILARITY, as known in the art, are relationships between two polypeptide sequences or two polynucleotide sequences, as determined by comparing the sequences. In the art, identity also means the degree of sequence relatedness between two polypeptide or two polynucleotide sequences as determined by the match between two strings of such sequences. Both identity and similarity can be readily calculated (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heijne, G., Academic Press, 1987; and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). While there exist a number of methods to measure identity and similarity between two polynucleotide or two polypeptide sequences, both terms are well known to skilled artisans (*Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heijne, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.* 48: 1073 (1988)). Methods commonly employed to determine identity or similarity between two sequences include, but are not limited to those disclosed in Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.* 48:1073 (1988). Preferred methods to determine identity are designed to give the largest match between the two sequences tested. Methods to determine identity and similarity are codified in computer programs. Preferred computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, GCG program package (Devereux, J., et al., (1984) *Nucleic Acids Research* 12(1): 387), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Atschul, S.F. et al. (1990) *J. Molec. Biol.* 215: 403).

公報番号 156216

ISOLATED means altered "by the hand of man" from its natural state; i.e., that, if it occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both.

For example, a naturally occurring polynucleotide or a polypeptide naturally present in a living organism in its natural state is not "isolated," but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated", as the term is employed herein. For example, with respect to polynucleotides, the term isolated means that it is separated from the chromosome and cell in which it naturally occurs.

As part of or following isolation, such polynucleotides can be joined to other polynucleotides, such as DNAs, for mutagenesis, to form fusion proteins, and for propagation or expression in a host, for instance. The isolated polynucleotides, alone or joined to other polynucleotides such as vectors, can be introduced into host cells, in culture or in whole organisms. Introduced into host cells in culture or in whole organisms, such DNAs still would be isolated, as the term is used herein, because they would not be in their naturally occurring form or environment. Similarly, the polynucleotides and polypeptides may occur in a composition, such as a media formulation, solutions for introduction of polynucleotides or polypeptides, for example, into cells, compositions or solutions for chemical or enzymatic reactions, for instance, which are not naturally occurring compositions, and therein remain isolated polynucleotides or polypeptides within the meaning of that term as it is employed herein.

LIGATION refers to the process of forming phosphodiester bonds between two or more polynucleotides, which most often are double stranded DNAs. Techniques for ligation are well known to the art and protocols for ligation are described in standard laboratory manuals and references, such as, for instance, Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) and Maniatis et al., pg. 146, as cited below.

OLIGONUCLEOTIDE(S) refers to relatively short polynucleotides. Often the term refers to single-stranded deoxyribonucleotides, but it can refer as well to single- or double-stranded ribonucleotides, RNA:DNA hybrids and double-stranded DNAs, among others.

Oligonucleotides, such as single-stranded DNA probe oligonucleotides, often are synthesized by chemical methods, such as those implemented on automated oligonucleotide synthesizers. However, oligonucleotides can be made by a variety of other methods, including *in vitro* recombinant DNA-mediated techniques and by expression of DNAs in cells and organisms.

Initially, chemically synthesized DNAs typically are obtained without a 5' phosphate. The 5' ends of such oligonucleotides are not substrates for phosphodiester bond formation by ligation

登録番号 156216

reactions that employ DNA ligases typically used to form recombinant DNA molecules. Where ligation of such oligonucleotides is desired, a phosphate can be added by standard techniques, such as those that employ a kinase and ATP.

The 3' end of a chemically synthesized oligonucleotide generally has a free hydroxyl group and, in the presence of a ligase, such as T4 DNA ligase, readily will form a phosphodiester bond with a 5' phosphate of another polynucleotide, such as another oligonucleotide. As is well known, this reaction can be prevented selectively, where desired, by removing the 5' phosphates of the other polynucleotide(s) prior to ligation.

PLASMIDS generally are designated herein by a lower case p preceded and/or followed by capital letters and/or numbers, in accordance with standard naming conventions that are familiar to those of skill in the art.

Starting plasmids disclosed herein are either commercially available, publicly available on an unrestricted basis, or can be constructed from available plasmids by routine application of well known, published procedures. Many plasmids and other cloning and expression vectors that can be used in accordance with the present invention are well known and readily available to those of skill in the art. Moreover, those of skill readily may construct any number of other plasmids suitable for use in the invention. The properties, construction and use of such plasmids, as well as other vectors, in the present invention will be readily apparent to those of skill from the present disclosure.

POLYNUCLEOTIDE(S) generally refers to any polynucleotide or polydeoxyribonucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. Thus, for instance, polynucleotides as used herein refers to, among others, single-and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded regions or single-, double- and triple-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded, or triple-stranded, or a mixture of single- and double-stranded regions.

In addition, polynucleotide as used herein refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The strands in such regions may be from the same molecule or from different molecules. The regions may include all of one or more of the molecules, but more typically involve only a region of some of the molecules. One of the molecules of a triple-helical region often is an oligonucleotide.

登録番号 156216

As used herein, the term polynucleotide includes DNAs or RNAs as described above that contain one or more modified bases. Thus, DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons are "polynucleotides" as that term is intended herein. Moreover, DNAs or RNAs comprising unusual bases, such as inosine, or modified bases, such as tritylated bases, to name just two examples, are polynucleotides as the term is used herein.

It will be appreciated that a great variety of modifications have been made to DNA and RNA that serve many useful purposes known to those of skill in the art. The term polynucleotide as it is employed herein embraces such chemically, enzymatically or metabolically modified forms of polynucleotides, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses and cells, including simple and complex cells, *in vivo*.

POLYPEPTIDES, as used herein, includes all polypeptides as described below. The basic structure of polypeptides is well known and has been described in innumerable textbooks and other publications in the art. In this context, the term is used herein to refer to any peptide or protein comprising two or more amino acids joined to each other in a linear chain by peptide bonds. As used herein, the term refers to both short chains, which also commonly are referred to in the art as peptides, oligopeptides and oligomers, for example, and to longer chains, which generally are referred to in the art as proteins, of which there are many types.

It will be appreciated that polypeptides often contain amino acids other than the 20 amino acids commonly referred to as the 20 naturally occurring amino acids, and that many amino acids, including the terminal amino acids, may be modified in a given polypeptide, either by natural processes, such as processing and other post-translational modifications, but also by chemical modification techniques which are well known to the art. Even the common modifications that occur naturally in polypeptides are too numerous to list exhaustively here, but they are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature, and they are well known to those of skill in the art.

Among the known modifications which may be present in polypeptides of the present are, to name an illustrative few, acetylation, alkylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, deacetylation, formation of covalent cross-links, formation of cysteine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristylation, oxidation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, recamization,

登録番号 156216

selenylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination.

Such modifications are well known to those of skill and have been described in great detail in the scientific literature. Several particularly common modifications, glycosylation, lipid attachment, sulfation, gamma-carboxylation of glutamic acid residues, hydroxylation and ADP-ribosylation, for instance, are described in most basic texts, such as, for instance *PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993). Many detailed reviews are available on this subject, such as, for example, those provided by Wold, F., *Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, pgs. 1-12 in *POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifert et al., (1990) *Meth. Enzymol.* 182:626-646 and Rattan et al., (1992) *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663: 48-62.

It will be appreciated, as is well known and as noted above, that polypeptides are not always entirely linear. For instance, polypeptides may be branched as a result of ubiquitination, and they may be circular, with or without branching, generally as a result of posttranslational events, including natural processing event and events brought about by human manipulation which do not occur naturally. Circular, branched and branched circular polypeptides may be synthesized by non-translation natural process and by entirely synthetic methods, as well.

Modifications can occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. In fact, blockage of the amino or carboxyl group in a polypeptide, or both, by a covalent modification, is common in naturally occurring and synthetic polypeptides and such modifications may be present in polypeptides of the present invention, as well. For instance, the amino terminal residue of polypeptides made in *E. coli* or other cells, prior to proteolytic processing, almost invariably will be N-formylmethionine. During post-translational modification of the peptide, a methionine residue at the NH<sub>2</sub>-terminus may be deleted. Accordingly, this invention contemplates the use of both the methionine-containing and the methionineless amino terminal variants of the protein of the invention.

The modifications that occur in a polypeptide often will be a function of how it is made. For polypeptides made by expressing a cloned gene in a host, for instance, the nature and extent of the modifications in large part will be determined by the host cell posttranslational modification capacity and the modification signals present in the polypeptide amino acid sequence. For

登録番号 156216

instance, as is well known, glycosylation often does not occur in bacterial hosts such as, for example, *E. coli*. Accordingly, when glycosylation is desired, a polypeptide should be expressed in a glycosylating host, generally a eukaryotic cell.

It will be appreciated that the same type of modification may be present in the same or varying degree at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications.

In general, as used herein, the term polypeptide encompasses all such modifications, particularly those that are present in polypeptides synthesized by expressing a polynucleotide in a host cell.

TRANSFORMATION is the process by which a cell is "transformed" by exogenous DNA when such exogenous DNA has been introduced inside the cell membrane. Exogenous DNA may or may not be integrated (covalently linked) into chromosomal DNA making up the genome of the cell. In prokaryotes and yeasts, for example, the exogenous DNA may be maintained on an episomal element, such as a plasmid. With respect to eukaryotic cells, a stably transformed or transfected cell is often one in which the exogenous DNA has become integrated into the chromosome so that it is inherited by daughter cells through chromosome replication. This stability is demonstrated by the ability of the eukaryotic cell to establish cell lines or clones comprised of a population of daughter cell containing the exogenous DNA.

VARIANT(S) of polynucleotides or polypeptides, as the term is used herein, are polynucleotides or polypeptides that differ from a reference polynucleotide or polypeptide, respectively. Variants in this sense are described below and elsewhere in the present disclosure in greater detail.

(1) A polynucleotide that differs in nucleotide sequence from another, reference polynucleotide. Generally, differences are limited so that the nucleotide sequences of the reference and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical.

As noted below, changes in the nucleotide sequence of the variant may be silent. That is, they may not alter the amino acids encoded by the polynucleotide. Where alterations are limited to silent changes of this type a variant will encode a polypeptide with the same amino acid sequence as the reference. Also as noted below, changes in the nucleotide sequence of the variant may alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Such nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, as discussed below.

登録番号 156216

(2) A polypeptide that differs in amino acid sequence from another, reference polypeptide.

Generally, differences are limited so that the sequences of the reference and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical.

A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, additions, deletions, fusions and truncations, which may be present in any combination.

#### DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to novel FAB I polypeptides and polynucleotides, among other things, as described in greater detail below. In particular, the invention relates to 10 polypeptides and polynucleotides of a novel FAB I gene of *Staphylococcus aureus*, which is related by amino acid sequence homology to Fab I enzymes from Mycobacteria (InhA), *H.influenzae*, *Brassica napus* (rape seed) enoyl-ACP reductase, and to the *E.coli* Fab I protein.

The invention relates especially to FAB I having the nucleotide and amino acid 15 sequences set out in Figure 2 [SEQ ID NO:1] and Figure 1 [SEQ ID NO:2] respectively, and to the FAB I nucleotide sequences in NCIMB Deposit No. 40771 and amino acid sequences encoded therefrom, which is herein referred to as "the deposited clone" or as the "DNA of the deposited clone." It will be appreciated that the nucleotide and amino acid sequences set out in Figure 1 [SEQ ID NO:2] and Figure 2 [SEQ ID NO:1] were obtained by sequencing the FAB I 20 DNA of the deposited clone. Hence, the sequence of the deposited clone is controlling as to any discrepancies between it (and the sequence it encodes) and the sequences of Figure 1 [SEQ ID NO:2] or Figure 2 [SEQ ID NO:1].

#### Polynucleotides

In accordance with one aspect of the present invention, there are provided isolated 25 polynucleotides which encode the FAB I polypeptide having the deduced amino acid sequence of Figure 1 [SEQ ID NO:2].

Using the information provided herein, such as the polynucleotide sequence set out in Figure 2 [SEQ ID NO:1], a polynucleotide of the present invention encoding FAB I polypeptides 30 may be obtained using standard cloning and screening procedures, such as those for cloning genomic DNAs from bacteria using *Staphylococcus aureus* WCUH29 cells as starting material. Illustrative of the invention, the polynucleotide set out in Figure 2 [SEQ ID NO:1] was discovered in a genomic DNA library derived from *Staphylococcus aureus* WCUH29.

整理番号 156216

FAB I of the invention is structurally related to other proteins of the enoyl-ACP reductase family, as shown by the results of sequencing the genomic DNA encoding FAB I in the deposited clone. The DNA sequence thus obtained is set out in Figure 2 [SEQ ID NO:1]. It contains an open reading frame encoding a protein of about 256 amino acid residues with a deduced molecular weight of about 27.99 kDa. The protein exhibits greatest homology to the *E.coli* Fab I protein among known proteins. FAB I of Figure 1 [SEQ ID NO:2] has about 44% identity and about 64% similarity with the amino acid sequence of *E.coli* enoyl (ACP) reductase (Fab I), SwissProt Accession Number P29132.

Polynucleotides of the present invention may be in the form of RNA, such as mRNA, or in 10 the form of DNA, including, for instance, cDNA and genomic DNA obtained by cloning or produced by chemical synthetic techniques or by a combination thereof. The DNA may be double-stranded or single-stranded. Single-stranded DNA may be the coding strand, also known as the sense strand, or it may be the non-coding strand, also referred to as the anti-sense strand.

The coding sequence which encodes the polypeptide may be identical to the coding 15 sequence of the polynucleotide shown in Figure 2 [SEQ ID NO:1]. It also may be a polynucleotide with a different sequence, which, as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code, encodes the polypeptide of the DNA of Figure 1 [SEQ ID NO:2].

Polynucleotides of the present invention which encode the polypeptide of Figure 1 [SEQ ID NO:2] may include, but are not limited to the coding sequence for the mature polypeptide, by 20 itself; the coding sequence for the mature polypeptide and additional coding sequences, such as those encoding a leader or secretory sequence, such as a pre-, or pro- or prepro- protein sequence; the coding sequence of the mature polypeptide, with or without the aforementioned additional coding sequences, together with additional, non-coding sequences, including for example, but not limited to non-coding 5' and 3' sequences, such as the transcribed, non-translated sequences that 25 play a role in transcription (including termination signals, for example), ribosome binding, mRNA stability elements, and additional coding sequence which encode additional amino acids, such as those which provide additional functionalities. Thus, for instance, the polypeptide may be fused to a marker sequence, such as a peptide, which facilitates purification of the fused polypeptide. In certain embodiments of this aspect of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine as discussed, this should include other tagging approaches peptide, such as the tag provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.), among others, many of which are commercially available. As described in Gentz et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86: 821-824, for instance, hexa-histidine provides for convenient purification of the fusion protein. The HA tag may also be used 30

登録番号 156216

to create fusion proteins and corresponds to an epitope derived of influenza hemagglutinin protein, which has been described by Wilson et al., (1984) *Cell* 37: 767, for instance.

In accordance with the foregoing, the term "polynucleotide encoding a polypeptide" as used herein encompasses polynucleotides which include a sequence encoding a polypeptide of the present invention, particularly staphylococcal FAB I having the amino acid sequence set out in Figure 1 [SEQ ID NO:2]. The term encompasses polynucleotides that include a single continuous region or discontinuous regions encoding the polypeptide (for example, interrupted by integrated phage, insertion sequence, recombination, or editing) together with additional regions, that also may contain coding and/or non-coding sequences.

The present invention further relates to variants of the herein above described polynucleotides which encode for fragments, analogs and derivatives of the polypeptide having the deduced amino acid sequence of Figure 1 [SEQ ID NO:2]. A variant of the polynucleotide may be a naturally occurring variant such as a naturally occurring allelic variant, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Such non-naturally occurring variants of the polynucleotide may be made by mutagenesis techniques, including those applied to polynucleotides, cells or organisms.

Among variants in this regard are variants that differ from the aforementioned polynucleotides by nucleotide substitutions, deletions or additions. The substitutions, deletions or additions may involve one or more nucleotides. The variants may be altered in coding or non-coding regions or both. Alterations in the coding regions may produce conservative or non-conservative amino acid substitutions, deletions or additions.

Among the particularly preferred embodiments of the invention in this regard are polynucleotides encoding polypeptides having the amino acid sequence of FAB I set out in Figure 1 [SEQ ID NO:2]; variants, analogs, derivatives and fragments thereof, and fragments of the variants, analogs and derivatives.

Further particularly preferred in this regard are polynucleotides encoding FAB I variants, analogs, derivatives and fragments, and variants, analogs and derivatives of the fragments, which have the amino acid sequence of FAB I polypeptide of Figure 1 [SEQ ID NO:2] in which several, a few, 5 to 10, 1 to 5, 1 to 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination. Especially preferred among these are silent substitutions, additions and deletions, which do not alter the properties and activities of FAB I. Also especially preferred in this regard are conservative substitutions. Most highly preferred are polynucleotides encoding polypeptides having the amino acid sequence of Figure 1 [SEQ ID NO:2], without substitutions.

並列番号 156216

Further preferred embodiments of the invention are polynucleotides that are at least 70% identical to a polynucleotide encoding FAB I polypeptide having the amino acid sequence set out in Figure 1 [SEQ ID NO:2], and polynucleotides which are complementary to such polynucleotides. Alternatively, most highly preferred are polynucleotides that comprise a region that is at least 80% identical to a polynucleotide encoding FAB I polypeptide encoded by the *Syphylloccoccus aureus* DNA of the deposited clone and polynucleotides complementary thereto or as set out in Figure 2 [SEQ ID NO:1]. In this regard, polynucleotides at least 90% identical to the same are particularly preferred, and among these particularly preferred polynucleotides, those with at least 95% are especially preferred. Furthermore, those with at least 97% are highly preferred among those with at least 95%, and among those with at least 98% and at least 99% are particularly highly preferred, with at least 99% being the more preferred.

Particularly preferred embodiments in this respect, moreover, are polynucleotides which encode polypeptides which retain substantially the same biological function or activity as the mature polypeptide encoded by the DNA of Figure 2 [SEQ ID NO:1].

15 The present invention further relates to polynucleotides that hybridize to the herein above-described sequences. In this regard, the present invention especially relates to polynucleotides which hybridize under stringent conditions to the herein above-described polynucleotides. As herein used, the term "stringent conditions" means hybridization will occur only if there is at least 95% and preferably at least 97% identity between the sequences.

20 As discussed additionally herein regarding polynucleotide assays of the invention, for instance, polynucleotides of the invention as discussed above, may be used as a hybridization probe for RNA, cDNA and genomic DNA to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding FAB I and to isolate cDNA and genomic clones of other genes that have a high sequence similarity to the FAB I gene. Such probes generally will comprise at least 15 bases. Preferably, such probes will have at least 30 bases and may have at least 50 bases. Particularly preferred probes will have at least 30 bases and will have 50 bases or less.

25 For example, the coding region of the FAB I gene may be isolated by screening using the known DNA sequence to synthesize an oligonucleotide probe. A labeled oligonucleotide having a sequence complementary to that of a gene of the present invention is then used to screen a library of cDNA, genomic DNA or mRNA to determine which members of the library the probe hybridizes to.

登録番号 156216

The polynucleotides and polypeptides of the present invention may be employed as research reagents and materials for discovery of treatments of and diagnostics for disease, particularly human disease, as further discussed herein relating to polynucleotide assays, *inter alia*.

- The polynucleotides of the invention that are oligonucleotides, including SEQ ID 5 NOS:3 and 4, derived from the sequence of SEQ ID NO:1 may be used as PCR primers in the processes herein described to determine whether or not the *Staphylococcus aureus* genes identified herein in whole or in part are transcribed in infected tissue. The invention also provides that such sequences may also have utility in diagnosis of the stage of infection and type of infection the pathogen has attained.
- 10 The polynucleotides may encode a polypeptide which is the mature protein plus additional amino or carboxyl-terminal amino acids, or amino acids interior to the mature polypeptide (when the mature form has more than one polypeptide chain, for instance). Such sequences may play a role in processing of a protein from precursor to a mature form, may allow protein transport, may lengthen or shorten protein half-life or may facilitate manipulation of a protein for assay or 15 production, among other things. As generally is the case *in vivo*, the additional amino acids may be processed away from the mature protein by cellular enzymes.

- A precursor protein, having the mature form of the polypeptide fused to one or more prosequences may be an inactive form of the polypeptide. When prosequences are removed such inactive precursors generally are activated. Some or all of the prosequences may be removed before activation. Generally, such precursors are called proproteins.

- In turn, a polynucleotide of the present invention may encode a mature protein, a mature protein plus a leader sequence (which may be referred to as a preprotein), a precursor of a mature protein having one or more prosequences which are not the leader sequences of a preprotein, or a preproprotein, which is a precursor to a proprotein, having a leader sequence and one or more prosequences, which generally are removed during processing steps that produce active and mature forms of the polypeptide.

#### Deposited materials

- A deposit containing a *Staphylococcus aureus* WCUH 29 strain has been deposited with the National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (NCIMB), 23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Scotland on 11 September 1995 and assigned NCIMB Deposit No. 40771. The FAB I clone deposit is referred to herein as "the deposited clone" or as "the DNA of the deposited clone."

登録番号 156216

The deposited material is a strain that contains the full length FAB I DNA, referred to as "NCIMB 40771° upon deposit.

The sequence of the polynucleotides contained in the deposited material, as well as the amino acid sequence of the polypeptide encoded thereby, are controlling in the event of any conflict with any description of sequences herein.

The deposit has been made under the terms of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Micro-organisms for Purposes of Patent Procedure. The strain will be irrevocably and without restriction or condition released to the public upon the issuance of a patent. The deposit is provided merely as convenience to those of skill in the art and is not an admission that a deposit is required for enablement, such as that required under 35 U.S.C. §112.

A license may be required to make, use or sell the deposited materials, and no such license is hereby granted.

#### Polypeptides

15 The present invention further relates to a prokaryotic FAB I polypeptide which has the deduced amino acid sequence of Figure 1 [SEQ ID NO:2].

The invention also relates to fragments, analogs and derivatives of these polypeptides. The terms "fragment," "derivative" and "analog" when referring to the polypeptide of Figure 1 [SEQ ID NO:2], means a polypeptide which retains essentially the same biological function or activity as such polypeptide. Thus, an analog includes a proprotein which can be activated by cleavage of the proprotein portion to produce an active mature polypeptide.

The polypeptide of the present invention may be a recombinant polypeptide, a natural polypeptide or a synthetic polypeptide. In certain preferred embodiments it is a recombinant polypeptide.

25 The fragment, derivative or analog of the polypeptide of Figure 1 [SEQ ID NO:2] may be (i) one in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably a conserved amino acid residue) and such substituted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code, or (ii) one in which one or more of the amino acid residues includes a substituent group, or (iii) one in which the mature polypeptide is fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the polypeptide (for example, polyethylene glycol), or (iv) one in which the additional amino acids are fused to the mature polypeptide, such as a leader or secretory sequence or a sequence which is employed for purification of the mature polypeptide or a proprotein sequence. Such fragments,

登録番号 156216

derivatives and analogs are deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

Among the particularly preferred embodiments of the invention in this regard are polypeptides having the amino acid sequence of FAB I set out in Figure 1 [SEQ ID NO:2] variants, analogs, derivatives and fragments thereof, and variants, analogs and derivatives of the fragments. Alternatively, particularly preferred embodiments of the invention in this regard are polypeptides having the amino acid sequence of the FAB I, variants, analogs, derivatives and fragments thereof, and variants, analogs and derivatives of the fragments.

Among preferred variants are those that vary from a reference by conservative amino acid substitutions. Such substitutions are those that substitute a given amino acid in a polypeptide by another amino acid of like characteristics. Typically seen as conservative substitutions are the replacements, one for another, among the aliphatic amino acids Ala, Val, Leu and Ile; interchange of the hydroxyl residues Ser and Thr; exchange of the acidic residues Asp and Glu; substitution between the amide residues Asn and Gln; exchange of the basic residues Lys and Arg and replacements among the aromatic residues Phe, Tyr.

Further particularly preferred in this regard are variants, analogs, derivatives and fragments, and variants, analogs and derivatives of the fragments, having the amino acid sequence of the FAB I polypeptide of Figure 1 [SEQ ID NO:2] in which several, a few, 5 to 10, 1 to 5, 1 to 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination. Especially preferred among these are silent substitutions, additions and deletions, which do not alter the properties and activities of the FAB I. Also especially preferred in this regard are conservative substitutions. Most highly preferred are polypeptides having the amino acid sequence of Figure 1 [SEQ ID NO:2] without substitutions.

The polypeptides and polymolecules of the present invention are preferably provided in an isolated form, and preferably are purified to homogeneity.

The polypeptides of the present invention include the polypeptide of SEQ ID NO:2 (in particular the mature polypeptide) as well as polypeptides which have at least 80% identity to the polypeptide of SEQ ID NO:2 and more preferably at least 90% similarity (more preferably at least 90% identity) to the polypeptide of SEQ ID NO:2 and still more preferably at least 95% similarity (still more preferably at least 95% identity) to the polypeptide of SEQ ID NO:2 and also include portions of such polypeptides with such portion of the polypeptide generally containing at least 30 amino acids and more preferably at least 50 amino acids.

登録番号 156216

Fragments or portions of the polypeptides of the present invention may be employed for producing the corresponding full-length polypeptide by peptide synthesis; therefore, the fragments may be employed as intermediates for producing the full-length polypeptides. Fragments or portions of the polymucinoids of the present invention may be used to synthesize full-length polymucinoids of the present invention.

5 Fragments

Also among preferred embodiments of this aspect of the present invention are polypeptides comprising fragments of FAB I, most particularly fragments of FAB I having the amino acid set out in Figure 1 [SEQ ID NO:2] and fragments of variants and derivatives of the FAB I of Figure 1 [SEQ ID NO:2].

In this regard a fragment is a polypeptide having an amino acid sequence that entirely is the same as part but not all of the amino acid sequence of the aforementioned FAB I polypeptides and variants or derivatives thereof.

Such fragments may be "free-standing" i.e., not part of or fused to other amino acids or polypeptides, or they may be comprised within a larger polypeptide of which they form a part or region. When comprised within a larger polypeptide, the presently discussed fragments most preferably form a single continuous region. However, several fragments may be comprised within a single larger polypeptide. For instance, certain preferred embodiments relate to a fragment of a FAB I polypeptide of the present comprised within a precursor polypeptide designed for expression in a host and having heterologous pre and pro-polypeptide regions fused to the amino terminus of the FAB I fragment and an additional region fused to the carboxyl terminus of the fragment. Therefore, fragments in one aspect of the meaning intended herein, refers to the portion or portions of a fusion polypeptide or fusion protein derived from FAB I.

Particularly preferred fragments include those encoded by amino acids 1-20, 21-40, 41-60, 61-80, 81-100, 101-120, 121-140, 141-160, 161-180, 181-200, 201-220, 221-240, 241-256 and contiguous combinations thereof.

More particularly preferred fragments include, for example, those with high homology to other sequenced structurally related elements. These include, for example, regions homologous to fragments of E.coli fabI including about 13 to about 25, about 32 to about 39, about 112 to about 125, about 156 to about 196 and about 231 to about 252. Among especially preferred fragments of the invention are truncation mutants of FAB I. Truncation mutants include FAB I polypeptides having the amino acid sequence of Figure 1 [SEQ ID NO:2] or of variants or derivatives thereof, except for deletion of a continuous series of residues (that is, a continuous

受理番号 156216

region, part or portion) that includes the amino terminus, or a continuous series of residues that includes the carboxyl terminus or, as in double truncation mutants, deletion of two continuous series of residues, one including the amino terminus and one including the carboxyl terminus. Fragments having the size ranges set out above also are preferred embodiments of truncation fragments, which are especially preferred among fragments generally. Degradation products of the polypeptides of the invention in a host cell, particularly a staphylococcus, are also preferred polypeptides.

Also preferred in this aspect of the invention are fragments characterized by structural or functional attributes of FAB I. Preferred embodiments of the invention in this regard include fragments that comprise alpha-helix and alpha-helix forming regions ("alpha-regions"), beta-sheet and beta-sheet-forming regions ("beta-regions"), turn and turn-forming regions ("turn-regions"), coil and coil-forming regions ("coil-regions"), hydrophilic regions, hydrophobic regions, alpha amphipathic regions, beta amphipathic regions, flexible regions, surface-forming regions and high antigenic index regions of FAB I.

Among the preferred fragments in this regard are those that comprise regions of FAB I that contain structural features, such as the features set out above. In this regard, the regions defined by the residues 1 to about 8, about 26 to about 34, about 39 to about 61, about 70 to about 80, about 95 to about 107, about 127 to about 139, about 162 to about 173 and about 207 to about 220 are characterized by amino acids believed to comprise alpha helix forming regions. Additionally, the regions defined by the residues about 9 to about 13, about 19 to about 25, about 62 to about 69, about 85 to about 95, about 141 to about 156, about 173 to about 188 about 220 to about 226, about 232 to about 240 are characterized by residues believed to comprise beta-sheet regions. Also, the regions defined by the residues about 80 to about 85, about 108 to about 112, about 120 to about 125, about 178 to about 183, and about 198 to about 203 are characterized by regions believed to comprise turn regions. Also, the regions defined by the residues about 80 to about 85, about 105 to about 110, about 120 to about 125, about 138 to about 143, about 145 to about 153, about 175 to about 180, about 187 to about 192, and about 240 to about 245 are characterized by amino acid compositions believed to comprise coil regions. The regions defined by the residues about 9 to about 14, about 20 to about 36, about 86 to about 98, about 115 to about 129, about 138 to about 152, about 161 to about 179, about 185 to about 195, about 226 to about 240, about 249 to about 256 are characterized by hydrophobic amino acids. Additionally, the regions defined by the residues about 2 to about 8, about 14 to about 19, about 36 to about 86, 98 to about 115, about 130 to about 138, about 152 to about 161, about 180 to about 186, about 206

登録番号 156216

to about 226, about 239 to and about 249 are characterized by hydrophilic amino acids. Also, the regions defined by the residues about 20 to about 40, about 43 to about 62, about 72 to about 93, about 102 to about 117, about 128 to about 140, about 180 to about 220, and about 228 to about 240 are characterized by amino acid residues believed to comprise an alpha amphipathic region. The regions defined by the residues about 1 to about 10, about 27 to about 50, about 60 to about 72, about 97 to about 110, about 158 to about 191, about 208 to about 220, and about 240 to about 252 are characterized by amino acid residues believed to comprise a beta amphipathic region. Additionally, the regions defined by the residues about 38 to 38, about 77 to about 89, about 98 to about 114, about 130 to about 142, about 190 to about 204, about 208 to about 230, and about 234 to about 246 are characteristic of amino acid residues believed to comprise flexible regions. The regions defined by residues about 34 to about 62, about 98 to about 112 and about 206 to about 222 are believed to comprise surface forming regions. Additionally, the regions defined by residues about 3 to about 9, about 14 to about 20, about 25 to about 33, about 38 to about 60, about 65 to about 88, about 98 to about 114, about 120 to about 124, about 130 to about 140, about 178 to about 185, about 195 to about 228, and about 236 to about 247 are believed to comprise regions of high antigenicity. Such regions set forth above may be comprised within a larger polypeptide or may be by themselves a preferred fragment of the present invention, as discussed above. It will be appreciated that the term "about" as used in this paragraph has the meaning set out above regarding fragments in general.

Further preferred regions are those that mediate activities of FAB L. Most highly preferred in this regard are fragments that have a chemical, biological or other activity of FAB L, including those with a similar activity or an improved activity, or with a decreased undesirable activity. Highly preferred in this regard are fragments that contain regions that are homologs in sequence, or in position, or in both sequences and to active regions of related polypeptides, such as the related polypeptides set out in Figure 1 [SEQ ID NO:2], which include E.coli Enoyl (ACP) reductase, Fab L. Among particularly preferred fragments in these regards are truncation mutants, as discussed above. Further preferred polynucleotide fragments are those that are antigenic or immunogenic in an animal, especially in a human.

It will be appreciated that the invention also relates to, among others, polynucleotides encoding the aforementioned fragments, polynucleotides that hybridize to polynucleotides encoding the fragments, particularly those that hybridize under stringent conditions, and polynucleotides, such as PCR primers, for amplifying polynucleotides that encode the fragments. In these regards,

登録番号 156216

preferred polynucleotides are those that correspond to the preferred fragments, as discussed above.

Vectors, host cells, expression

The present invention also relates to vectors which comprise a polynucleotide or polynucleotides of the present invention, host cells which are genetically engineered with vectors of the invention and the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques.

Host cells can be genetically engineered to incorporate polynucleotides and express polypeptides of the present invention. For instance, polynucleotides may be introduced into host cells using well known techniques of infection, transduction, transfection, transvection and transformation. The polynucleotides may be introduced alone or with other polynucleotides. Such other polynucleotides may be introduced independently, co-introduced or introduced joined to the polynucleotides of the invention.

Thus for instance, the polynucleotides may be joined to a vector containing a selectable marker for propagation in a host. The vector construct may be introduced into host cells by the aforementioned techniques. Generally, a plasmid vector is introduced as DNA in a precipitate, such as a calcium phosphate precipitate, or in a complex with a charged lipid. Electroporation also may be used to introduce polynucleotides into a host. If the vector is a virus, it may be packaged in vitro or introduced into a packaging cell and the packaged virus may be transduced into cells. A wide variety of techniques suitable for making polynucleotides and for introducing polynucleotides into cells in accordance with this aspect of the invention are well known and routine to those of skill in the art. Such techniques are reviewed at length in Sambrook et al. cited above, which is illustrative of the many laboratory manuals that detail these techniques. In accordance with this aspect of the invention the vector may be, for example, a plasmid vector, a single or double-stranded phage vector, a single or double-stranded RNA or DNA viral vector. Such vectors may be introduced into cells as polynucleotides, preferably DNA, by well known techniques for introducing DNA and RNA into cells. The vectors, in the case of phage and viral vectors also may be and preferably are introduced into cells as packaged or encapsidated virus by well known techniques for infection and transduction. Viral vectors may be replication competent or replication defective. In the latter case viral propagation generally will occur only in complementing host cells.

Preferred among vectors, in certain respects, are those for expression of polynucleotides and polypeptides of the present invention. Generally, such vectors comprise cis-acting control regions effective for expression in a host operatively linked to the polynucleotide to be expressed.

登録番号 156216

Appropriate trans-acting factors either are supplied by the host, supplied by a complementing vector or supplied by the vector itself upon introduction into the host.

In certain preferred embodiments in this regard, the vectors provide for specific expression. Such specific expression may be inducible expression or expression only in certain types of cells or both inducible and cell-specific. Particularly preferred among inducible vectors are vectors that can be induced for expression by environmental factors that are easy to manipulate, such as temperature and nutrient additives. A variety of vectors suitable to this aspect of the invention, including constitutive and inducible expression vectors for use in prokaryotic and eukaryotic hosts, are well known and employed routinely by those of skill in the art.

10 The engineered host cells can be cultured in conventional nutrient media, which may be modified as appropriate for, *inter alia*, activating promoters, selecting transformants or amplifying genes. Culture conditions, such as temperature, pH and the like, previously used with the host cell selected for expression generally will be suitable for expression of polypeptides of the present invention as will be apparent to those of skill in the art.

15 A great variety of expression vectors can be used to express a polypeptide of the invention. Such vectors include, among others, chromosomal, episomal and virus-derived vectors, e.g., vectors derived from bacterial plasmids, from bacteriophage, from transposons, from yeast episomes, from insertion elements, from yeast chromosomal elements, from viruses such as baculoviruses, papova viruses, such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fowl pox viruses, 20 pseudorabies viruses and retroviruses, and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements, such as cosmids and phagemids, all may be used for expression in accordance with this aspect of the present invention. Generally, any vector suitable to maintain, propagate or express polynucleotides to express a polypeptide in a host may be used for expression in this regard.

25 The appropriate DNA sequence may be inserted into the vector by any of a variety of well-known and routine techniques. In general, a DNA sequence for expression is joined to an expression vector by cleaving the DNA sequence and the expression vector with one or more restriction endonucleases and then joining the restriction fragments together using T4 DNA ligase. Procedures for restriction and ligation that can be used to this end are well known and routine to those of skill. Suitable procedures in this regard, and for constructing expression vectors using alternative techniques, which also are well known and routine to those skill, are set forth in great detail in Sambrook et al., (1989) *MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

登録番号 156216

The DNA sequence in the expression vector is operatively linked to appropriate expression control sequence(s), including, for instance, a promoter to direct mRNA transcription. Representatives of such promoters include the phage lambda PL promoter, the *E. coli* lac, trp and tac promoters, the SV40 early and late promoters and promoters of retroviral LTRs, to name just a few of the well-known promoters. It will be understood that numerous promoters not mentioned are suitable for use in this aspect of the invention are well known and readily may be employed by those of skill in the manner illustrated by the discussion and the examples herein.

In general, expression constructs will contain sites for transcription initiation and termination and, in the transcribed region, a ribosome binding site for translation. The coding portion of the mature transcripts expressed by the constructs will include a translation initiating AUG at the beginning and a termination codon appropriately positioned at the end of the polypeptides to be translated.

In addition, the constructs may contain control regions that regulate as well as engender expression. Generally, in accordance with many commonly practiced procedures, such regions will operate by controlling transcription, such as transcription factors, repressor binding sites and termination, among others.

Vectors for propagation and expression generally will include selectable markers. Such markers also may be suitable for amplification or the vectors may contain additional markers for this purpose. In this regard, the expression vectors preferably contain one or more selectable marker genes to provide a phenotypic trait for selection of transformed host cells. Preferred markers include dihydrofolate reductase or neomycin resistance for eukaryotic cell culture, and tetracycline or ampicillin resistance genes for culturing *E. coli* and other prokaryotes.

The vector containing the appropriate DNA sequence as described elsewhere herein, as well as an appropriate promoter, and other appropriate control sequences, may be introduced into an appropriate host using a variety of well known techniques suitable to expression therein of a desired polypeptide. Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells, such as streptococci, staphylococci, *E. coli*, streptomycetes and *Salmonella typhimurium* cells; fungal cells, such as yeast cells and *Aspergillus* cells; insect cells such as *Drosophila S2* and *Spodoptera Sf9* cells; animal cells such as CHO, COS and Bowes melanoma cells; and plant cells. Hosts for a great variety of expression constructs are well known, and those of skill will be enabled by the present disclosure readily to select a host for expressing a polypeptides in accordance with this aspect of the present invention.

整理番号 156216

More particularly, the present invention also includes recombinant constructs, such as expression constructs, comprising one or more of the sequences described above. The constructs comprise a vector, such as a plasmid or viral vector, into which such a sequence of the invention has been inserted. The sequence may be inserted in a forward or reverse orientation. In certain 5 preferred embodiments in this regard, the construct further comprises regulatory sequences, including, for example, a promoter, operably linked to the sequence. Large numbers of suitable vectors and promoters are known to those of skill in the art, and there are many commercially available vectors suitable for use in the present invention.

The following vectors, which are commercially available, are provided by way of 10 example. Among vectors preferred for use in bacteria are pQE70, pQE60 and pQE-9, available from Qiagen; pBS vectors, Phagescript vectors, Bluescript vectors, pNH8A, pNH16A, pNH46A, available from Stratagene; and pTrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRITS available from Pharmacia. Among preferred eukaryotic vectors are pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 and pSG available from Stratagene; and pSVK3, pBPV, pMSG and pSVL 15 available from Pharmacia. These vectors are listed solely by way of illustration of the many commercially available and well known vectors that are available to those of skill in the art for use in accordance with this aspect of the present invention. It will be appreciated that any other plasmid or vector suitable for, for example, introduction, maintenance, propagation or expression of a polynucleotide or polypeptide of the invention in a host may be used in this aspect of the 20 invention.

Promoter regions can be selected from any desired gene using vectors that contain a reporter transcription unit lacking a promoter region, such as a chloramphenicol acetyl transferase ("CAT") transcription unit, downstream of restriction site or sites for introducing a candidate promoter fragment; i.e., a fragment that may contain a promoter. As is well known, introduction 25 into the vector of a promoter-containing fragment at the restriction site upstream of the *cat* gene engenders production of CAT activity, which can be detected by standard CAT assays. Vectors suitable to this end are well known and readily available. Two such vectors are pKK232-8 and pCM7. Thus, promoters for expression of polynucleotides of the present invention include not only well known and readily available promoters, but also promoters that readily may be obtained 30 by the foregoing technique, using a reporter gene.

Among known prokaryotic promoters suitable for expression of polynucleotides and polypeptides in accordance with the present invention are the *E. coli* lacI and lacZ and promoters, the T3 and T7 promoters, the *gvp* promoter, the lambda PR, PL promoters and the trp promoter.

登録番号 166216

Among known eukaryotic promoters suitable in this regard are the CMV immediate early promoter, the HSV thymidine kinase promoter, the early and late SV40 promoters, the promoters of retroviral LTRs, such as those of the Rous sarcoma virus ("RSV"), and metallothionein promoters, such as the mouse metallothionein-I promoter.

5 Selection of appropriate vectors and promoters for expression in a host cell is a well known procedure and the requisite techniques for expression vector construction, introduction of the vector into the host and expression in the host are routine skills in the art.

The present invention also relates to host cells containing the above-described constructs discussed above. The host cell can be a higher eukaryotic cell, such as a mammalian cell, or a 10 lower eukaryotic cell, such as a yeast cell, or the host cell can be a prokaryotic cell, such as a bacterial cell.

Introduction of the construct into the host cell can be effected by calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic introduction, infection or other methods. 15 Such methods are described in many standard laboratory manuals, such as Davis et al., (1986) *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, and Sambrook et al., (1989) *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y..

Constructs in host cells can be used in a conventional manner to produce the gene product 20 encoded by the recombinant sequence. Alternatively, the polypeptides of the invention can be synthetically produced by conventional peptide synthesizers.

Mature proteins can be expressed in mammalian cells, yeast, bacteria, or other cells under the control of appropriate promoters. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention. 25 Appropriate cloning and expression vectors for use with prokaryotic and eukaryotic hosts are described by Sambrook et al., (1989) *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y..

Generally, recombinant expression vectors will include origins of replication, a promoter 30 derived from a highly-expressed gene to direct transcription of a downstream structural sequence, and a selectable marker to permit isolation of vector containing cells after exposure to the vector. Among suitable promoters are those derived from the genes that encode glycolytic enzymes such as 3-phosphoglycerate kinase ("PGK"),  $\alpha$ -factor, acid phosphatase, and heat shock proteins, among

登録番号 156216

others. Selectable markers include the ampicillin resistance gene of *E. coli* and the trp1 gene of *S. cerevisiae*.

Transcription of the DNA encoding the polypeptides of the present invention by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are *cis*-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp that act to increase transcriptional activity of a promoter in a given host cell-type. Examples of enhancers include the SV40 enhancer, which is located on the late side of the replication origin at bp 100 to 270, the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers.

- 10 Polynucleotides of the invention, encoding the heterologous structural sequence of a polypeptide of the invention generally will be inserted into the vector using standard techniques so that it is operably linked to the promoter for expression. The polynucleotide will be positioned so that the transcription start site is located appropriately 5' to a ribosome binding site. The ribosome binding site will be 5' to the AUG that initiates translation of the polypeptide to be expressed.
- 15 Generally, there will be no other open reading frames that begin with an initiation codon, usually AUG, and lie between the ribosome binding site and the initiating AUG. Also, generally, there will be a translation stop codon at the end of the polypeptide and there will be a polyadenylation signal and a transcription termination signal appropriately disposed at the 3' end of the transcribed region.

For secretion of the translated protein into the lumen of the endoplasmic reticulum, into the periplasmic space or into the extracellular environment, appropriate secretion signals may be incorporated into the expressed polypeptide. These signals may be endogenous to the polypeptide or they may be heterologous signals.

The polypeptide may be expressed in a modified form, such as a fusion protein, and may include not only secretion signals but also additional heterologous functional regions. Thus, for instance, a region of additional amino acids, particularly charged amino acids, may be added to the N-terminus of the polypeptide to improve stability and persistence in the host cell, during purification or during subsequent handling and storage. Also, region also may be added to the polypeptide to facilitate purification. Such regions may be removed prior to final preparation of the polypeptide. The addition of peptide moieties to polypeptides to engender secretion or excretion, to improve stability or to facilitate purification, among others, are familiar and routine techniques in the art. A preferred fusion protein comprises a heterologous region from immunoglobulin that is useful to solubilize or purify polypeptides. For example, EP-A-O 464 533 (Canadian counterpart 2045869) discloses fusion proteins comprising various portions of

登録番号 156216

constant region of immunoglobulin molecules together with another human protein or part thereof. In many cases, the Fc part in fusion protein is thoroughly advantageous for use in therapy and diagnosis and thus results, for example, in improved pharmacokinetic properties (see EP-A 0232 262). On the other hand, for some uses it would be desirable to be able to 5 delete the Fc part after the fusion protein has been expressed, detected and purified in the advantageous manner described. This is the case when Fc portion proves to be a hindrance to use in assays, therapy or diagnosis, for example when the fusion protein is to be used as antigen for immunizations. In drug discovery, for example, human proteins, such as, sHIL-5, has been fused with Fc portions for the purpose of high-throughput screening assays to 10 identify antagonists of hIL-5. See, D. Bennett et al. (1995) *Journal of Molecular Recognition*, Vol. 8 52-58 and K. Johanson et al. (1995) *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, No. 16, pp 9459-9471.

Suitable prokaryotic hosts for propagation, maintenance or expression of polynucleotides and polypeptides in accordance with the invention include streptococci, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Salmonella typhimurium*. Various species of *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and *Staphylococcus* are also suitable hosts in this regard. Moreover, many other hosts also known to those of skill may be employed in this regard.

As a representative but non-limiting example, useful expression vectors for bacterial use can comprise a selectable marker and bacterial origin of replication derived from commercially 20 available plasmids comprising genetic elements of the well known cloning vector pBR322 (ATCC 37017). Such commercial vectors include, for example, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). These pBR322 "backbone" sections are combined with an appropriate promoter and the structural sequence to be expressed.

Following transformation of a suitable host strain and growth of the host strain to an 25 appropriate cell density, where the selected promoter is inducible it is induced by appropriate means (e.g., temperature shift or exposure to chemical inducer) and cells are cultured for an additional period.

Cells typically then are harvested by centrifugation, disrupted by physical or chemical means, and the resulting crude extract retained for further purification.

30 Microbial cells employed in expression of proteins can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents, such methods are well known to those skilled in the art.

並列番号 156216

Various mammalian cell culture systems can be employed for expression, as well. Examples of mammalian expression systems include the COS-7 lines of monkey kidney fibroblast, described in Gluzman et al., (1981) *Cell* 23: 175. Other cell lines capable of expressing a compatible vector include for example, the C127, 3T3, CHO, HeLa, human kidney 293 and BHK cell lines.

5 Mammalian expression vectors may comprise an origin of replication, a suitable promoter and enhancer, and also any necessary ribosome binding sites, polyadenylation sites, splice donor and acceptor sites, transcriptional termination sequences, and 5' flanking non-transcribed sequences that are necessary for expression. In certain preferred embodiments in this regard DNA sequences derived from the SV40 splice sites, and the SV40 polyadenylation sites are used for required non-transcribed genetic elements of these types.

10 FAB I polypeptides can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography ("HPLC") is employed for purification. Well known techniques for refolding protein may be employed to regenerate active conformation when the polypeptide is denatured during isolation and/or purification. This invention also provides the use of anti-FAB I antibodies for detection of FAB I 15 during purification.

20 Polypeptides of the present invention include naturally purified products, products of chemical synthetic procedures, and products produced by recombinant techniques from a prokaryotic or eukaryotic host, including, for example, bacterial, yeast, higher plant, insect and mammalian cells. Depending upon the host employed in a recombinant production procedure, the 25 polypeptides of the present invention may be glycosylated or may be non-glycosylated. In addition, polypeptides of the invention may also include an initial modified methionine residue, in some cases as a result of host-mediated processes.

30 FAB I polymers and polypeptides may be used in accordance with the present invention for a variety of applications, particularly those that make use of the chemical and biological properties of FAB I. Additional applications relate to diagnosis and to treatment of disorders of cells, tissues and organisms. These aspects of the invention are illustrated further by the following discussion.

#### Polymer assay

登録番号 156216

- This invention is also related to the use of the FAB I polynucleotides to detect complementary polynucleotides such as, for example, as a diagnostic reagent. Detection of FAB I in a eukaryote, particularly a mammal, and especially a human, will provide a diagnostic method that can add to, define or allow a diagnosis of a disease. Eukaryotes (herein also "individual(s)"), particularly mammals, and especially humans, carrying a FAB I gene may be detected at the DNA level by a variety of techniques. Nucleic acids for diagnosis may be obtained from an individual's cells and tissues, such as bone, blood, muscle, cartilage, and skin. Tissue biopsy and autopsy material is also preferred for samples from an individual to use in a diagnostic assay. Genomic DNA may be used directly for detection or may be amplified enzymatically by using PCR prior to analysis. PCR (Saiki et al., (1986) *Nature*, 324: 163-166). RNA or cDNA may also be used in the same ways. As an example, PCR primers complementary to the nucleic acid encoding FAB I can be used to identify and analyze FAB I presence and expression. Using PCR, characterization of the strain of prokaryote present in a eukaryote, particularly a mammal, and especially a human, may be made by an analysis of the genotype of the prokaryote gene. For example, deletions and insertions can be detected by a change in size of the amplified product in comparison to the genotype of a reference sequence. Point mutations can be identified by hybridizing amplified DNA to radiolabeled FAB I RNA or alternatively, radiolabeled FAB I antisense DNA sequences. Perfectly matched sequences can be distinguished from mismatched duplexes by RNase A digestion or by differences in melting temperatures.
- Sequence differences between a reference gene and genes having mutations also may be revealed by direct DNA sequencing. In addition, cloned DNA segments may be employed as probes to detect specific DNA segments. The sensitivity of such methods can be greatly enhanced by appropriate use of PCR or another amplification method. For example, a sequencing primer is used with double-stranded PCR product or a single-stranded template molecule generated by a modified PCR. The sequence determination is performed by conventional procedures with radiolabeled nucleotide or by automatic sequencing procedures with fluorescent-tags.
- Genetic testing based on DNA sequence differences may be achieved by detection of alteration in electrophoretic mobility of DNA fragments in gels, with or without denaturing agents. Small sequence deletions and insertions can be visualized by high resolution gel electrophoresis. DNA fragments of different sequences may be distinguished on denaturing formamide gradient gels in which the mobilities of different DNA fragments are retarded in the gel at different positions according to their specific melting or partial melting temperatures (see, e.g., Myers et al., (1985) *Science*, 230: 1242).

登録番号 156216

Sequence changes at specific locations also may be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S1 protection or the chemical cleavage method (e.g., Cotton et al., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85: 4397-4401).

Thus, the detection of a specific DNA sequence may be achieved by methods such as 5 hybridization, RNase protection, chemical cleavage, direct DNA sequencing or the use of restriction enzymes, (e.g., restriction fragment length polymorphisms ("RFLP") and Southern blotting of genomic DNA.

In addition to more conventional gel-electrophoresis and DNA sequencing, mutations also can be detected by *in situ* analysis.

10 A mutation may be ascertained for example, by a DNA sequencing assay. Samples are processed by methods known in the art to capture the RNA. First strand cDNA is synthesized from the RNA samples by adding an oligonucleotide primer consisting of sequences which hybridize to a region on the mRNA. Reverse transcriptase and deoxynucleotides are added to allow synthesis of the first strand cDNA. Primer sequences are synthesized based on the DNA 15 sequence of the FAB I protein of the invention. The primer sequence is generally comprised of at least 15 consecutive bases, and may contain at least 30 or even 50 consecutive bases.

整理番号 156216

Cells carrying mutations in the gene of the present invention may also be detected at the DNA level by a variety of techniques, to allow for serotyping, for example. Nucleic acids for diagnosis may be obtained from an individual's cells or bodily fluids, including but not limited to blood, urine, saliva, tissue biopsy and autopsy material. The genomic DNA may be used directly for detection or may be amplified enzymatically by using PCR (Saiki *et al.*, (1986) *Nature*, 324:163-166) prior to analysis. RT-PCR can also be used to detect mutations. It is particularly preferred to used RT-PCR in conjunction with automated detection systems, such as, for example, GeneScan. RNA or cDNA may also be used for the same purpose, PCR or RT-PCR. As an example, PCR primers complementary to the nucleic acid encoding FAB I can be used to identify and analyze mutations. Examples of representative primers are shown below in Table 1. For example, deletions and insertions can be detected by a change in size of the amplified product in comparison to the normal genotype. Point mutations can be identified by hybridizing amplified DNA to radiolabeled RNA or alternatively, radiolabeled antisense DNA sequences. Perfectly matched sequences can be distinguished from mismatched duplexes by RNase A digestion or by differences in melting temperatures.

Table 1

Primers used for detection of mutations in FAB I gene

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>SEQUENCE</u>
3	5'-CGCCTCGAGATGTTAAATCTTGAAAACAAAACATATGTC-3'
20 4	5'-CGCGGATCCAATCAAGTCAGGTGAAATATCCA-3'

The above primers may be used for amplifying FAB I DNA isolated from a sample derived from an individual. The invention also provides the primers of Table 1 with 1, 2, 3 or 4 nucleotides removed from the 5' and/or the 3' end. The primers may be used to amplify the gene isolated from the individual such that the gene may then be subject to various techniques for elucidation of the DNA sequence. In this way, mutations in the DNA sequence may be determined, for example, to ascertain the serotype of the organism.

Sequence differences between the reference gene and genes having mutations may be revealed by the direct DNA sequencing method. In addition, cloned DNA segments may be employed as probes to detect specific DNA segments. The sensitivity of this method is greatly enhanced when combined with PCR. For example, a sequencing primer is used with double-stranded PCR product or a single-stranded template molecule generated by a modified PCR. The sequence determination is performed by conventional procedures with radiolabeled nucleotide or by automatic sequencing procedures with fluorescent-tags.

整理番号 156216

Genotyping based on DNA sequence differences may be achieved by detection of alteration in electrophoretic mobility of DNA fragments in gels with or without denaturing agents. Small sequence deletions and insertions can be visualized by high resolution gel electrophoresis. DNA fragments of different sequences may be distinguished on denaturing formamide gradient gels in which the mobilities of different DNA fragments are retarded in the gel at different positions according to their specific melting or partial melting temperatures (see, e.g., Myers et al., (1985) *Science*, 230:1242).

Sequence changes at specific locations may also be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S1 protection or the chemical cleavage method (e.g., Cotton et al., (1985) *PNAS USA*, 82:4397-4401).

Thus, the detection of a specific DNA sequence and/or quantitation of the level of the sequence may be achieved by methods such as hybridization, RNase protection, chemical cleavage, direct DNA sequencing or the use of restriction enzymes, (e.g., Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)) and Southern blotting of genomic DNA. The invention provides a process for diagnosing disease, particularly bacterial infections, and most particularly staphylococcal infections, comprising determining from a sample derived from an individual an increased level of expression of polynucleotide having the sequence of Figure 2 [SEQ ID NO:1]. Increased expression of polynucleotide can be measured using any one of the methods well known in the art for the quantitation of polynucleotides, such as, for example, PCR, RT-PCR, RNase protection, Northern blotting and other hybridization methods.

In addition to more conventional gel-electrophoresis and DNA sequencing, mutations can also be detected by *in situ* analysis.

#### Polypeptide assays

The present invention also relates to a diagnostic assays such as quantitative and diagnostic assays for detecting levels of FAB I protein in cells and tissues, including determination of normal and abnormal levels. Thus, for instance, a diagnostic assay in accordance with the invention for detecting a pathological expression level of FAB I protein compared to normal control tissue samples may be used to detect the presence of bacterial infection, for example. Assay techniques that can be used to determine levels of a protein, such as an FAB I protein of the present invention, in a sample derived from a host are well-known to those of skill in the art. Such assay methods include radioimmunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis and ELISA assays. Among these ELISAs frequently are preferred. An ELISA assay initially comprises preparing an antibody specific to FAB I, preferably a monoclonal antibody. In addition

登録番号 156216

For preparation of monoclonal antibodies, any technique which provides antibodies produced by continuous cell line cultures can be used. Examples include the hybridoma technique (Kohler, G. et al., (1975) *Nature* 256: 495-497, the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., (1983) *Immunology Today* 4: 72 and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole et al., (1985) in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96.

Techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Patent No. 4,946,778) can be adapted to produce single chain antibodies to immunogenic polypeptide products of this invention. Also, transgenic mice, or other organisms such as other mammals, may 10 be used to express humanized antibodies to immunogenic polypeptide products of this invention.

Polypeptide derivatives include antigenically or immunologically equivalent derivatives which form a particular aspect of this invention.

The term "antigenically equivalent derivative" as used herein encompasses a polypeptide or its equivalent which will be specifically recognised by certain antibodies 15 which, when raised to the protein or polypeptide according to the present invention, interferes with the immediate physical interaction between pathogen and mammalian host.

The term "immunologically equivalent derivative" as used herein encompasses a peptide or its equivalent which when used in a suitable formulation to raise antibodies in a vertebrate, the antibodies act to interfere with the immediate physical interaction between 20 pathogen and mammalian host.

The polypeptide, such as an antigenically or immunologically equivalent derivative or a fusion protein thereof is used as an antigen to immunize a mouse or other animal such as a rat or chicken. The fusion protein may provide stability to the polypeptide. The antigen may be associated, for example by conjugation, with an immunogenic carrier 25 protein for example bovine serum albumin (BSA) or keyhole limpet haemocyanin (KLH). Alternatively a multiple antigenic peptide comprising multiple copies of the protein or polypeptide, or an antigenically or immunologically equivalent polypeptide thereof may be sufficiently antigenic to improve immunogenicity so as to obviate the use of a carrier.

Using the procedure of Kohler et al. (1975) *Nature* 256 , 495-497, antibody-containing cells from the immunised mammal are fused with myeloma cells to create 30 hybridoma cells secreting monoclonal antibodies.

The hybridomas are screened to select a cell line with high binding affinity and favorable cross reaction with either staphylococcal species using one or more of the original

登録番号 156216

polypeptide and/or the fusion protein. The selected cell line is cultured to obtain the desired Mab.

Hybridoma cell lines secreting the monoclonal antibody are another aspect of this invention.

5      Alternatively phage display technology could be utilised to select antibody genes with binding activities towards the polypeptide either from repertoires of PCR amplified v-genes of lymphocytes from humans screened for possessing anti-Fbp or from naive libraries (McCafferty, J. et al., (1990), *Nature* 348, 552-554; Marks, J. et al., (1992) *BioTechnology* 10, 779-783). The affinity of these antibodies can also be improved by chain shuffling  
10     (Clackson, T. et al., (1991) *Nature* 352, 624-628).

The antibody should be screened again for high affinity to the polypeptide and/or fusion protein.

15     The above-described antibodies may be employed to isolate or to identify clones expressing the polypeptide or purify the polypeptide of the present invention by attachment of the antibody to a solid support for isolation and/or purification by affinity chromatography.

20     The polypeptide may be used as an antigen for vaccination of a host to produce specific antibodies which protect against invasion of bacteria, for example by blocking adherence of bacteria to damaged tissue. Examples of tissue damage include wounds in skin or connective tissue caused, e.g., by mechanical, traumatic, chemical or thermal damage or by implantation of indwelling devices, or wounds in the mucous membranes, such as the mouth, mammary glands, urethra or vagina.

25     The polypeptides or cells expressing them can be used as an immunogen to produce antibodies thereto. These antibodies can be, for example, polyclonal or monoclonal antibodies. The term antibodies also includes chimeric, single chain, and humanized antibodies, as well as Fab fragments, or the product of an Fab expression library. Various procedures known in the art may be used for the production of such antibodies and fragments.

30     Antibodies generated against the polypeptides of the present invention can be obtained by direct injection of the polypeptides into an individual or by administering the polypeptides to an individual, preferably a nonhuman. The antibody so obtained will then bind the polypeptides itself. In this manner, even a sequence encoding only a fragment of the polypeptides can be used to generate antibodies binding the whole native polypeptides. Such antibodies can then be used to isolate the polypeptide from tissue expressing that polypeptide.

登記番号 156216

As mentioned above, a fragment of the final antibody may be prepared.

The antibody may be either intact antibody of  $M_r$  approx 150,000 or a derivative of it, for example a Fab fragment or a Fv fragment as described in Skerra, A and Pluckthun, A (1988) *Science* 240 1038-1040. If two antigen binding domains are present each domain 5 may be directed against a different epitope - termed 'bispecific' antibodies.

The antibody of the invention may be prepared by conventional means for example by established monoclonal antibody technology (Kohler, G. et al (1975), *Nature* 256, 495-497) or using recombinant means e.g. combinatorial libraries, for example as described in Huse, W.D. et al., (1989) *Science* 246, 1275-1281.

10 Preferably the antibody is prepared by expression of a DNA polymer encoding said antibody in an appropriate expression system such as described above for the expression of polypeptides of the invention. The choice of vector for the expression system will be determined in part by the host, which may be a prokaryotic cell, such as *E. coli* (preferably strain B) or *Streptomyces* sp. or a eukaryotic cell, such as a mouse C127, mouse myeloma, 15 human HeLa, Chinese hamster ovary, filamentous or unicellular fungi or insect cell. The host may also be a transgenic animal or a transgenic plant, for example as described in Hunt, A et al. (1989) *Nature* 34, 76-78. Suitable vectors include plasmids, bacteriophages, cosmids and recombinant viruses, derived from, for example, baculoviruses and vaccinia.

20 The Fab fragment may also be prepared from its parent monoclonal antibody by enzyme treatment, for example using papain to cleave the Fab portion from the Fc portion.

25 Preferably the antibody or derivative thereof is modified to make it less immunogenic in the individual. For example, if the individual is human the antibody may most preferably be 'humanised'; where the complementarity determining region(s) of the hybridoma-derived antibody has been transplanted into a human monoclonal antibody, for example as described in Jones, P. et al. (1986), *Nature* 321, 522-525 or Tempest et al., (1991) *Biotechnology* 9, 266-273.

The modification need not be restricted to one of 'humanisation'; other primate sequences (for example Newman, R. et al., 1992, *Biotechnology* 10, 1455-1460) may also be used.

30 The humanised monoclonal antibody, or its fragment having binding activity, form a particular aspect of this invention.

This invention provides a method of screening drugs to identify those which interfere with the interaction of the FAB I protein or active fragment to mammalian cells, the method comprising incubating a mammalian cell or membrane preparation with labeled

登録番号 156216

polypeptide in the presence of the drug and measuring the ability of the drug to block this interaction.

The use of a polynucleotide of the invention in genetic immunization will preferably employ a suitable delivery method such as direct injection of plasmid DNA into

- 5 muscles (Wolff et al., (1992) *Hum Mol Genet*, 1:363, Manthorpe et al., (1963) *Hum Gene Ther.* 4, 419), delivery of DNA complexed with specific protein carriers (Wu, et al. (1989) *J Biol Chem* 264, 16985), coprecipitation of DNA with calcium phosphate (Bevenisty & Reshef, PNAS, 1986;83,9551), encapsulation of DNA in various forms of liposomes (Kaneda et al., (1989) *Science* 243, 375), particle bombardment (Tang et al., (1992) *Nature* 356:152,
- 10 Eisenbraun et al., (1993) *DNA Cell Biol* 12:791) and *in vivo* infection using cloned retroviral vectors (Seeger et al., (1984) PNAS 81, 5849). Suitable promoters for muscle transfection include CMV, RSV, SRα, actin, MCK, alpha globin, adenovirus and dihydrofolate reductase.

Thus, among others, antibodies against FAB I may be employed to inhibit FAS or FAB I enzymatic activity or FAB I expression.

- 15 FAB I may also be employed to inhibit infections including, but not limited to infections of upper respiratory tract (e.g. otitis media, bacterial tracheitis, acute epiglottitis, thyroiditis), lower respiratory (e.g. empyema, lung abscess), cardiac (e.g. infective endocarditis), gastrointestinal (e.g. secretory diarrhoea, splenic abscess, retroperitoneal abscess), CNS (e.g. cerebral abscess), eye (e.g. blepharitis, conjunctivitis, keratitis, endophthalmitis, preseptal and orbital cellulitis, 20 dacryocystitis), kidney and urinary tract (e.g. epididymitis, intrarenal and perinephric abscess, toxic shock syndrome), skin (e.g. impetigo, folliculitis, cutaneous abscesses, cellulitis, wound infection, bacterial myositis), and bone and joint (e.g. septic arthritis, osteomyelitis).

- 25 FAB I may also be employed to treat bacterial infection, such as, for example, infections of upper respiratory tract (e.g. otitis media, bacterial tracheitis, acute epiglottitis, thyroiditis), lower respiratory (e.g. empyema, lung abscess), cardiac (e.g. infective endocarditis), gastrointestinal (e.g. secretory diarrhoea, splenic abscess, retroperitoneal abscess), CNS (e.g. cerebral abscess), eye (e.g. blepharitis, conjunctivitis, keratitis, endophthalmitis, preseptal and orbital cellulitis, dacryocystitis), kidney and urinary tract (e.g. epididymitis, intrarenal and perinephric abscess, toxic shock syndrome), skin (e.g. impetigo, folliculitis, cutaneous abscesses, cellulitis, wound 30 infection, bacterial myositis), and bone and joint (e.g. septic arthritis, osteomyelitis).

#### FAB I binding molecules and assays

This invention also provides a method for identification of molecules, such as binding molecules, that bind FAB I. Genes encoding proteins that bind FAB I, such as binding proteins,

登録番号 156216

can be identified by numerous methods known to those of skill in the art. Examples of such methods are described in many laboratory manuals such as, for instance, Coligan *et al.*, (1991) *Current Protocols in Immunology* 1(2); Chapter 5.

For instance, expression cloning may be employed for this purpose. To this end, to isolate genes in an individual which are responsive to FAB I, polyadenylated RNA is prepared from a cell responsive to FAB I, a cDNA library is created from this RNA, the library is divided into pools and the pools are transfected individually into cells that are not responsive to FAB I. The transfected cells then are exposed to labeled FAB I. (FAB I can be labeled by a variety of well-known techniques including standard methods of radio-iodination or inclusion of a recognition site for a site-specific protein kinase.) Following exposure, the cells are fixed and binding of FAB I is determined. These procedures conveniently are carried out on glass slides.

Alternatively a labeled ligand can be photoaffinity linked to a cell extract, such as a membrane or a membrane extract, prepared from cells that express a molecule that it binds, such as a binding molecule. Cross-linked material is resolved by polyacrylamide gel electrophoresis ("PAGE") and exposed to X-ray film. The labeled complex containing the ligand-binding can be excised, resolved into peptide fragments, and subjected to protein microsequencing. The amino acid sequence obtained from microsequencing can be used to design unique or degenerate oligonucleotides probes to screen cDNA libraries to identify genes encoding the putative binding molecule.

Polypeptides of the invention also can be used to assess FAB I binding capacity of FAB I binding molecules, such as binding molecules, in cells or in cell-free preparations.

#### Antagonists and Agonists - assays and molecules

The invention also provides a method of screening compounds to identify those which enhance or block the action of FAB I on cells, such as its interaction with FAB I-binding molecules such as binding molecules. An antagonist is a compound which decreases the natural biological functions of FAB I. An agonist is a compound which increases the natural biological functions of FAB I.

For example, a cellular component, such as a membrane, cell envelope or cell wall, or a preparation of any thereof, may be prepared from a cell that expresses a molecule that binds FAB I, such as a molecule of a physiological pathway modulated or affected by FAB I, such as, for example, a regulatory pathway, such as a FAS pathway. The preparation is incubated with labeled FAB I in the absence or the presence of a candidate molecule which may be a FAB I agonist or antagonist. The ability of the candidate molecule to bind the binding molecule is

整理番号 156216

reflected in decreased binding of the labeled ligand. Molecules which bind gratuitously, i.e., without inducing the effects of FAB I on binding the FAB I binding molecule, are most likely to be good antagonists. Molecules that bind well and elicit effects that are the same as or closely related to FAB I are agonists.

5 FAB I-like effects of potential agonists and antagonists may be measured, for instance, by determining activity of a second messenger system following interaction of the candidate molecule with a cell or appropriate cell preparation, and comparing the effect with that of FAB I or molecules that elicit the same effects as FAB I. Second messenger systems that may be useful in this regard include but are not limited to AMP guanylate cyclase, ion channel or phosphoinositide hydrolysis second messenger systems.

10 Another example of an assay for FAB I antagonists is a competitive assay that combines FAB I and a potential antagonist with membrane-bound FAB I binding molecules or recombinant FAB I binding molecules under appropriate conditions for a competitive inhibition assay. FAB I can be labeled, such as by radioactivity, such that the number of FAB I molecules bound to a 15 binding molecule can be determined accurately to assess the effectiveness of the potential antagonist.

15 A further example of a screen is a detect the reduction of crotonyl-CoA by measuring the consumption of NADH. Crotonyl-ACP may also be used in place of crotonyl-CoA in such a screen. Test compound are added to the reaction mix to determine the effect on the 20 reduction of crotonyl-CoA or crotonyl-ACP. Agonists can be identified if the level of reduction is increased and antagonists can be identified if the level of reduction is decreased. Diazoboronic or palmitoyl CoA may be used as a positive control for antagonism. It is preferred that these screens be used in a highthroughput assay using a microtitre plate format and a plate reader.

25 Potential antagonists include small organic molecules, peptides, polypeptides and antibodies that bind to a polypeptide of the invention and thereby inhibit or extinguish its activity. Potential antagonists also may be small organic molecules, a peptide, a polypeptide such as a closely related protein or antibody that binds the same sites on a binding molecule, such as a binding molecule, without inducing FAB I-induced activities, thereby preventing the action of FAB 30 I by excluding FAB I from binding.

Potential antagonists include a small molecule which binds to and occupies the binding site of the polypeptides thereby preventing binding to cellular binding molecules, such as binding

登録番号 156216

molecules, such that normal biological activity is prevented. Examples of small molecules include but are not limited to small organic molecules, peptides or peptide-like molecules.

Potential antagonists also include diazaborine mimics (Boron substituted for sulphur, carbon, or oxygen) and mimic of activated isomiazid.

5 Other potential antagonists include antisense molecules. Antisense technology can be used to control gene expression through antisense DNA or RNA or through triple-helix formation. Antisense techniques are discussed, for example, in - Okano, J. (1991) *Neurochem.* 56:560; *OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). Triple helix formation is discussed in, for instance Lee et al.,  
10 (1979) *Nucleic Acids Research* 6: 3073; Cooney et al., (1988) *Science* 241: 456; and Dervan et al., (1991) *Science* 251: 1360. The methods are based on binding of a polynucleotide to a complementary DNA or RNA. For example, the 5' coding portion of a polynucleotide that encodes  
15 the mature polypeptide of the present invention may be used to design an antisense RNA oligonucleotide of from about 10 to 40 base pairs in length. A DNA oligonucleotide is designed to be complementary to a region of the gene involved in transcription thereby preventing transcription and the production of FAB I. The antisense RNA oligonucleotide hybridizes to the mRNA *in vivo* and blocks translation of the mRNA molecule into FAB I polypeptide. The oligonucleotides described above can also be delivered to cells such that the antisense RNA or DNA may be expressed *in vivo* to inhibit production of FAB I.

20 The antagonists may be employed in a composition with a pharmaceutically acceptable carrier, e.g., as hereinafter described.

The antagonists may be employed for instance to inhibit diseases including, but not limited to infections of upper respiratory tract (e.g. otitis media, bacterial tracheitis, acute epiglottitis, thyroiditis), lower respiratory (e.g. empyema, lung abscess), cardiac (e.g. infective endocarditis),  
25 gastrointestinal (e.g. secretory diarrhoea, splenic abscess, retroperitoneal abscess), CNS (e.g. cerebral abscess), eye (e.g. blepharitis, conjunctivitis, keratitis, endophthalmitis, preseptal and orbital cellulitis, dacryocystitis), kidney and urinary tract (e.g. epididymitis, intrarenal and perinephric abscess, toxic shock syndrome), skin (e.g. impetigo, folliculitis, cutaneous abscesses, cellulitis, wound infection, bacterial myositis), and bone and joint (e.g. septic arthritis, osteomyelitis).

In a particular aspect the invention provides the use of the polypeptide, polynucleotide or inhibitor of the invention to interfere with the immediate physical interaction between a pathogen and mammalian host responsible for sequelae of infection. In

登録番号 156216

particular the molecules of the invention may be used: i) in the prevention of adhesion of bacteria, in particular gram positive bacteria, to mammalian extracellular matrix proteins on in-dwelling devices or to extracellular matrix proteins in wounds; ii) to block FAB I protein mediated mammalian cell invasion by, for example, initiating phosphorylation of mammalian tyrosine kinases (Rosenshine et al., (1992) *Infect. Immun.* 60, 2211-7); iii) to block bacterial adhesion between mammalian extracellular matrix proteins and bacterial FAB I proteins which mediate tissue damage; and/or iv) to block the normal progression of pathogenesis in infections initiated other than by the implantation of in-dwelling devices or by other surgical techniques.

10 The antagonists may be employed in a composition with a pharmaceutically acceptable carrier, e.g., as hereinafter described.

15 Each of the DNA sequences provided herein may be used in the discovery and development of antibacterial compounds. The encoded protein upon expression can be used as a target for the screening of antibacterial drugs. Additionally, the DNA sequences encoding the amino terminal regions of the encoded protein or Shine-Delgarno or other translation facilitating sequences of the respective mRNA can be used to construct antisense sequences to control the expression of the coding sequence of interest.

20 In view of the conservation in the amino acid sequence of FAB I with known enzymes in *H.influenzae*, *E.coli* and *S.typhimurium*, an antibacterial targeted at FAB I agonist and antagonist compounds provided by the invention are believed to be active against a wide variety of Gram negative and positive organisms. In addition, a Fab I homolog (InhA) has been identified in *Mycobacterium tuberculosis*. Therefore, an antibacterial provided by the invention, targeted at FAB I, may also have anti-mycobacterial activity. Further, since Diazaborine derivatives inhibit LPS biosynthesis (Lam et al (1987) *J. Antimicrob. Chemother.* 20 37-45) and LPS is a known virulence factor, the invention provides antibacterial compounds targeted at FAB I that have enhanced activity *in vivo*.

#### Vaccines

30 Another aspect of the invention relates to a method for inducing an immunological response in a mammal which comprises inculcating the mammal with FAB I, or a fragment or variant thereof, adequate to produce antibody to protect said animal from disease, particularly a bacterial infection, and especially a staphylococcal infection. Yet another aspect of the invention relates to a method of inducing immunological response in a mammal

登録番号 156216

which comprises, through gene therapy, delivering gene encoding FAB I, or a fragment or a variant thereof, for expressing FAB I, or a fragment or a variant thereof *in vivo* in order to induce an immunological response to produce antibody to protect said animal from disease.

A further aspect of the invention relates to an immunological composition which, 5 when introduced into a mammalian host, induces an immunological response in that mammal to a given FAB I or protein coded therefrom, wherein the composition comprises a recombinant FAB I or protein coded therefrom comprising DNA which codes for and expresses an antigen of said gene or protein coded therefrom.

FAB I or a fragment thereof may be fused with co-protein which may not by itself 10 produce antibodies, but is capable of stabilizing the first protein and producing a fused protein which will have immunogenic and protective properties. Thus fused recombinant protein, preferably further comprises an antigenic co-protein, such as Glutathione-S-transferase (GST) or beta-galactosidase, relatively large co-proteins which solubilize the protein and facilitate production and purification thereof. Moreover, the co-protein may act 15 as an adjuvant in the sense of providing a generalized stimulation of the immune system. The co-protein may be attached to either the amino or carboxy terminus of the first protein.

Included in the present invention are methods for the introduction into an individual polypeptides or polymucleotides of the invention along with an immunostimulatory DNA sequence to enhance the immune response to FAB I, and compositions comprising FAB I and 20 an immunostimulatory DNA sequence. Such immunostimulatory DNA sequences and their uses are described in Sato, et al., (1996) *Science* 273: 352.

The present invention also includes a vaccine formulation which comprises the immunogenic recombinant protein together with a suitable carrier. Since the protein may be broken down in the stomach, it is preferably administered parenterally (including 25 subcutaneous, intramuscular, intravenous, intradermal etc. injection). Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes which render the formulation isotonic with the blood of the recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents or thickening agents. The formulations 30 may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampoules and vials and may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier immediately prior to use. The vaccine formulation may also include adjuvant systems for enhancing the immunogenicity of the formulation, such as oil-in water systems.

登録番号 156216

and other systems known in the art. The dosage will depend on the specific activity of the vaccine and can be readily determined by routine experimentation.

Whilst the invention has been described with reference to certain FAB I, it is to be understood that this covers fragments of the naturally occurring protein and similar proteins  
5 (for example, having sequence homologies of 50% or greater) with additions, deletions or substitutions which do not substantially affect the immunogenic properties of the recombinant protein.

#### Compositions

The invention also relates to compositions comprising the polynucleotide or the  
10 polypeptides discussed above or the agonists or antagonists. Thus, the polypeptides of the present invention may be employed in combination with a non-sterile or sterile carrier or carriers for use with cells, tissues or organisms, such as a pharmaceutical carrier suitable for administration to a subject. Such compositions comprise, for instance, a media additive or a therapeutically effective amount of a polypeptide of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.  
15 Such carriers may include, but are not limited to, saline, buffered saline, dextrose, water, glycerol, ethanol and combinations thereof. The formulation should suit the mode of administration.

#### Kits

The invention further relates to pharmaceutical packs and kits comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the aforementioned compositions of the  
20 invention. Associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, reflecting approval by the agency of the manufacture, use or sale of the product for human administration.

Also provided by the invention are diagnostic kits for the FAB I gene and homologs will enable the directed therapy of a FAB I directed antibacterial. DNA hybridisation or protein (monoclonal antibody) based kits for the identification of Fab I and homologs of FAB I from different species. Such a kit could also detect mutations in the FAB I gene /protein and its homologs.

#### Administration

30 Polypeptides and other compounds of the present invention may be employed alone or in conjunction with other compounds, such as therapeutic compounds.

整理番号 166216

The pharmaceutical compositions may be administered in any effective, convenient manner including, for instance, administration by topical, oral, anal, vaginal, intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intranasal or intradermal routes among others.

5 The pharmaceutical compositions generally are administered in an amount effective for treatment or prophylaxis of a specific indication or indications. In general, the compositions are administered in an amount of at least about 10 µg/kg body weight. In most cases they will be administered in an amount not in excess of about 8 mg/kg body weight per day. Preferably, in most cases, dose is from about 10 µg/kg to about 1 mg/kg body weight, daily. It will be appreciated that optimum dosage will be determined by standard methods for each treatment  
10 modality and indication, taking into account the indication, its severity, route of administration, complicating conditions and the like.

In therapy or as a prophylactic, the active agent may be administered to a individual as an injectable composition, for example as a sterile aqueous dispersion, preferably isotonic.

Alternatively the composition may be formulated for topical application  
15 for example in the form of ointments, creams, lotions, eye ointments, eye drops, ear drops, mouthwash, impregnated dressings and sutures and aerosols, and may contain appropriate conventional additives, including, for example, preservatives, solvents to assist drug penetration, and emollients in ointments and creams. Such topical formulations may also contain compatible conventional carriers, for example cream or ointment bases, and ethanol or octyl alcohol for lotions. Such carriers may constitute from about 1% to about 98% by weight of the formulation; more usually they will constitute up to about 80% by weight of the formulation.  
20

For administration to human individuals, it is expected that the daily dosage level of the active agent will be from 0.01 to 10 mg/kg, typically around 1 mg/kg. The physician in  
25 any event will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual and will vary with the age, weight and response of the particular individual. The above dosages are exemplary of the average case. There can, of course, be individual instances where higher or lower dosage ranges are merited, and such are within the scope of this invention.

In-dwelling devices include surgical implants, prosthetic devices and catheters, i.e.,  
30 devices that are introduced to the body of an individual and remain in position for an extended time. Such devices include, for example, artificial joints, heart valves, pacemakers, vascular grafts, vascular catheters, cerebrospinal fluid shunts, urinary catheters, continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) catheters, etc.

登録番号 156216

The composition of the invention may be administered by injection to achieve a systemic effect against relevant bacteria shortly before insertion of an in-dwelling device. Treatment may be continued after surgery during the in-body time of the device. In addition, the composition could also be used to broaden perioperative cover for any surgical technique to prevent staphylococcal wound infections.

Many orthopaedic surgeons consider that individuals with prosthetic joints should be considered for antibiotic prophylaxis before dental treatment that could produce a bacteraemia. Late deep infection is a serious complication sometimes leading to loss of the prosthetic joint and is accompanied by significant morbidity and mortality. It may therefore be possible to extend the use of the active agent as a replacement for prophylactic antibiotics in this situation.

In addition to the therapy described above, the compositions of this invention may be used generally as a wound treatment agent to prevent adhesion of bacteria to matrix proteins exposed in wound tissue and for prophylactic use in dental treatment as an alternative to, or in conjunction with, antibiotic prophylaxis.

Alternatively, the composition of the invention may be used to bathe an indwelling device immediately before insertion. The active agent will preferably be present at a concentration of 1μg/ml to 10mg/ml for bathing of wounds or indwelling devices.

A vaccine composition is conveniently in injectable form. Conventional adjuvants may be employed to enhance the immune response.

A suitable unit dose for vaccination is 0.5-5μg/kg of antigen, and such dose is preferably administered 1-3 times and with an interval of 1-3 weeks.

With the indicated dose range, no adverse toxicological effects will be observed with the compounds of the invention which would preclude their administration to suitable individuals.

The antibodies described above may also be used as diagnostic reagents to detect the presence of bacteria containing the FAB I protein.

In order to facilitate understanding of the following example certain frequently occurring methods and/or terms will be described.

30 Gene therapy

The FAB I polynucleotides, polypeptides, agonists and antagonists that are polypeptides may be employed in accordance with the present invention by expression of such polypeptides *in vivo*, in treatment modalities often referred to as "gene therapy." The compounds of the inventions

登録番号 156216

may be used as gene immunotherapies, i.e. engender an immune response in an individual against the organism from which such compound was derived as well as related organisms.

Thus, for example, cells from an individual may be engineered with a polynucleotide, such as a DNA or RNA, encoding a polypeptide *ex vivo*, and the engineered cells then can be provided to an individual to be treated with the polypeptide. For example, cells may be engineered *ex vivo* by the use of a retroviral plasmid vector containing RNA encoding a polypeptide of the present invention. Such methods are well-known in the art and their use in the present invention will be apparent from the teachings herein.

Similarly, cells may be engineered *in vivo* for expression of a polypeptide *in vivo* by procedures known in the art. For example, a polynucleotide of the invention may be engineered for expression in a replication defective retroviral vector, as discussed above. The retroviral expression construct then may be isolated and introduced into a packaging cell is transduced with a retroviral plasmid vector containing RNA encoding a polypeptide of the present invention such that the packaging cell now produces infectious viral particles containing the gene of interest. These producer cells may be administered to an individual for engineering cells *in vivo* and expression of the polypeptide *in vivo*. These and other methods for administering a polypeptide of the present invention by such method should be apparent to those skilled in the art from the teachings of the present invention.

Retroviruses from which the retroviral plasmid vectors herein above mentioned may be derived include, but are not limited to, Moloney Murine Leukemia Virus, spleen necrosis virus, retroviruses such as Rous Sarcoma Virus, Harvey Sarcoma Virus, avian leukosis virus, gibbon ape leukemia virus, human immunodeficiency virus, adenovirus, Mycoproliferative Sarcoma Virus, and mammary tumor virus. In one embodiment, the retroviral plasmid vector is derived from Moloney Murine Leukemia Virus.

Such vectors will include one or more promoters for expressing the polypeptide. Suitable promoters which may be employed include, but are not limited to, the retroviral LTR; the SV40 promoter; and the human cytomegalovirus (CMV) promoter described in Miller et al., (1989) *Biotechniques* 7: 980-990, or any other promoter (e.g., cellular promoters such as eukaryotic cellular promoters including, but not limited to, the histone, RNA polymerase III, and  $\beta$ -actin promoters). Other viral promoters which may be employed include, but are not limited to, adenovirus promoters, thymidine kinase (TK) promoters, and B19 parvovirus promoters. The selection of a suitable promoter will be apparent to those skilled in the art from the teachings contained herein.

登録番号 156216

The nucleic acid sequence encoding the polypeptide of the present invention will be placed under the control of a suitable promoter. Suitable promoters which may be employed include, but are not limited to, adenoviral promoters, such as the adenoviral major late promoter, or heterologous promoters, such as the cytomegalovirus (CMV) promoter; the RSV promoter; 5 inducible promoters, such as the MMT promoter, the metallothionein promoter; heat shock promoters; the albumin promoter; the  $\beta$ -galactosidase promoter; human globin promoters; viral thymidine kinase promoters, such as the Herpes Simplex thymidine kinase promoter; retroviral LTRs (including the modified retroviral LTRs herein above described); the  $\beta$ -actin promoter; and human growth hormone promoters. The promoter also may be the native promoter which controls the 10 gene encoding the polypeptide.

The retroviral plasmid vector is employed to transduce packaging cell lines to form producer cell lines. Examples of packaging cells which may be transfected include, but are not limited to, the PES01, PA317, Y-2, Y-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, YCRE, YCRIP, 15 GP+E-86, GP+envAm12, and DAN cell lines as described in Miller, A., (1990) *Human Gene Therapy 1: 5-14*. The vector may be transduced into the packaging cells through any means known in the art. Such means include, but are not limited to, electroporation, the use of liposomes, and  $\text{CaPO}_4$  precipitation. In one alternative, the retroviral plasmid vector may be encapsulated into a liposome, or coupled to a lipid, and then administered to a host.

The producer cell line will generate infectious retroviral vector particles, which include the 20 nucleic acid sequence(s) encoding the polypeptides. Such retroviral vector particles then may be employed to transduce eukaryotic cells, either *in vitro* or *in vivo*. The transduced eukaryotic cells will express the nucleic acid sequence(s) encoding the polypeptide. Eukaryotic cells which may be transduced include, but are not limited to, embryonic stem cells, embryonic carcinoma cells, as well 25 as hematopoietic stem cells, hepatocytes, fibroblasts, myoblasts, keratinocytes, endothelial cells, and bronchial epithelial cells.

#### EXAMPLES

The present invention is further described by the following examples. The examples are provided solely to illustrate the invention by reference to specific embodiments. These exemplifications, while illustrating certain specific aspects of the invention, do not portray the 30 limitations or circumscribe the scope of the disclosed invention.

Certain terms used herein are explained in the foregoing glossary.

All examples were carried out using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail. Routine molecular

登録番号 156216

biology techniques of the following examples can be carried out as described in standard laboratory manuals, such as Sambrook et al., (1989) *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y..

All parts or amounts set out in the following examples are by weight, unless otherwise specified.

Unless otherwise stated size separation of fragments in the examples below was carried out using standard techniques of agarose and polyacrylamide gel electrophoresis ('PAGE') in Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) and numerous other references such as, for instance, by Goeddel et al., (1980) *Nucleic Acids Res.* 8: 4057.

Unless described otherwise, ligations were accomplished using standard buffers, incubation temperatures and times, approximately equimolar amounts of the DNA fragments to be ligated and approximately 10 units of T4 DNA ligase ("ligase") per 0.5 µg of DNA.

**Example 1 Isolation and sequencing of *S. aureus* FAB I gene**

The polynucleotide having the DNA sequence given in SEQ ID NO:1 was obtained from the sequencing of a library of clones of chromosomal DNA of *S. aureus* WCUH 29 in *E. coli*. It has been demonstrated by the process herein described that it is transcribed *in vivo* in an established infection of *S. aureus* WCUH 29 in a mouse model of infection.

To obtain the polynucleotide encoding FAB I protein using the DNA sequence given in SEQ ID NO:1 typically a library of clones of chromosomal DNA of *S. aureus* WCUH 29 in *E. coli* or some other suitable host is probed with a radiolabelled oligonucleotide, preferably a 17mer or longer, derived from the partial sequence. Clones carrying DNA identical to that of the probe can then be distinguished using high stringency washes. By sequencing the individual clones thus identified with sequencing primers designed from the original sequence it is then possible to extend the sequence in both directions to determine the full gene sequence. Conveniently such sequencing is performed using denatured double stranded DNA prepared from a plasmid clone. Suitable techniques are described by Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook et al., (1989) *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. (see Screening By Hybridization 1.90 and Sequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70).

In some cases the sequencing data from two or more clones containing overlapping *S. aureus* WCUH 29 DNA was used to construct the contiguous DNA sequence in SEQ ID

登録番号 156216

NO.1. Libraries may be prepared Libraries may be prepared by routine methods, for example: *Methods 1 and 2*

Total cellular DNA is isolated from *Staphylococcus aureus* strain WCUH 29(NCIMB 40771) according to standard procedures and size-fractionated by either of two

5 methods.

*Method 1*

Total cellular DNA is mechanically sheared by passage through a needle in order to size-fractionate according to standard procedures. DNA fragments of up to 11kbp in size are rendered blunt by treatment with exonuclease and DNA polymerase, and EcoRI linkers 10 added. Fragments are ligated into the vector Lambda ZapII that has been cut with EcoRI, the library packaged by standard procedures and *E.coli* infected with the packaged library. The library is amplified by standard procedures.

*Method 2*

Total cellular DNA is partially hydrolysed with a combination of four restriction enzymes (RsaI, PstI, AluI and Bsh1235I) and size-fractionated according to standard 15 procedures. EcoRI linkers are ligated to the DNA and the fragments then ligated into the vector Lambda ZapII that have been cut with EcoRI, the library packaged by standard procedures, and *E.coli* infected with the packaged library. The library is amplified by standard procedures.

20 Example 2 FAB I enzyme activity assay

The activity of FAB I protein may be measured using either crotonoyl-CoA or crotonoyl-ACP as a substrate (Bergler, et al. (1994), *J.Biol.Chem.* 269, 5493-5496) and monitoring the decrease in absorbance at 340nm due to the consumption of NADH. Crotonoyl-ACP (Km 22uM) is a better substrate than crotonoyl-CoA (Km 2.7mM). 25 crotonoyl-CoA is available from Sigma (C6146). A drazoborine derivative may be used as a positive control, this should be readily available via a 2 step synthesis with publicly available starting materials using methods known in the art. Test compounds may be added to this assay to determine whether they agonize or antagonize enzymatic activity.

Example 3 Gene immunotherapeutic expression of *S. aureus* FAB I

30 Fibroblasts are obtained from a subject by skin biopsy. The resulting tissue is placed in tissue-culture medium and separated into small pieces. Small chunks of the tissue are placed on a wet surface of a tissue culture flask, approximately ten pieces are placed in each flask. The flask is turned upside down, closed tight and left at room temperature overnight. After 24 hours at room

登録番号 156216

temperature, the flask is inverted - the chunks of tissue remain fixed to the bottom of the flask - and fresh media is added (e.g., Ham's F12 media, with 10% FBS, penicillin and streptomycin). The tissue is then incubated at 37°C for approximately one week. At this time, fresh media is added and subsequently changed every several days. After an additional two weeks in culture, a monolayer of fibroblasts emerges. The monolayer is trypsinized and scaled into larger flasks.

A vector for gene therapy is digested with restriction enzymes for cloning a fragment to be expressed. The digested vector is treated with calf intestinal phosphatase to prevent self-ligation. The dephosphorylated, linear vector is fractionated on an agarose gel and purified.

FAB I DNA capable of expressing active FAB I, is isolated. The ends of the fragment are modified, if necessary, for cloning into the vector. For instance, 5' overhanging may be treated with DNA polymerase to create blunt ends. 3' overhanging ends may be removed using S1 nuclease. Linkers may be ligated to blunt ends with T4 DNA ligase.

Equal quantities of the Moloney murine leukaemia virus linear backbone and the FAB I fragment are mixed together and joined using T4 DNA ligase. The ligation mixture is used to transform *E. coli* and the bacteria are then plated onto agar-containing kanamycin. Kanamycin phenotype and restriction analysis confirm that the vector has the properly inserted gene.

Packaging cells are grown in tissue culture to confluent density in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10% calf serum (CS), penicillin and streptomycin. The vector containing the FAB I gene is introduced into the packaging cells by standard techniques. Infectious viral particles containing the FAB I gene are collected from the packaging cells, which now are called producer cells.

Fresh media is added to the producer cells, and after an appropriate incubation period media is harvested from the plates of confluent producer cells. The media, containing the infectious viral particles, is filtered through a Millipore filter to remove detached producer cells. The filtered media then is used to infect fibroblast cells. Media is removed from a sub-confluent plate of fibroblasts and quickly replaced with the filtered media. Polybrene (Aldrich) may be included in the media to facilitate transduction. After appropriate incubation, the media is removed and replaced with fresh media. If the titer of virus is high, then virtually all fibroblasts will be infected and no selection is required. If the titer is low, then it is necessary to use a retroviral vector that has a selectable marker, such as *neo* or *his*, to select out transduced cells for expansion.

登録番号 156216

Engineered fibroblasts then may be injected into rats, either alone or after having been grown to confluence on microcarrier beads, such as cytotex 3 beads. The injected fibroblasts produce PAB I product, and the biological actions of the protein are conveyed to the host.

It will be clear that the invention may be practiced otherwise than as particularly described  
5 in the foregoing description and examples.

Numerous modifications and variations of the present invention are possible in light of the above teachings and, therefore, are within the scope of the appended claims.

監理番号 156216

## SEQUENCE LISTING

## (1) GENERAL INFORMATION

(1) APPLICANT: Lonsdale, John  
Milner, Peter  
Payne, David  
Pearson, Stewart

(ii) TITLE OF THE INVENTION: Novel FabI

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 2

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: SmithKline Beecham Corporation  
(B) STREET: 709 Swedeland Road  
(C) CITY: King of Prussia  
(D) STATE: PA  
(E) COUNTRY: USA  
(F) ZIP: 19406-0939

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Diskette  
(B) COMPUTER: IBM Compatible  
(C) OPERATING SYSTEM: DOS  
(D) SOFTWARE: FastSEQ for Windows Version 2.0

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:  
(B) FILING DATE: 28-August-1997  
(C) CLASSIFICATION:

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: 60/024845  
(B) FILING DATE: 28-AUG-1996

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Gimmi, Edward R  
(B) REGISTRATION NUMBER: 38,891  
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: GM50005

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: 610-270-4478

整理番号 156216

(B) TELEFAX: 610-270-5090  
 (C) TELEX:

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 256 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: protein

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Met	Leu	Asn	Leu	Glu	Asn	Lys	Thr	Tyr	Val	Ile	Met	Gly	Ile	Ala	Asn	
1						5				10					15	
Lys	Arg	Ser	Ile	Ala	Phe	Gly	Val	Ala	Lys	Val	Leu	Asp	Gln	Leu	Gly	
										20			25		30	
Ala	Lys	Leu	Val	Phe	Thr	Tyr	Arg	Lys	Glu	Arg	Ser	Arg	Lys	Glu	Leu	
										35		40		45		
Glu	Lys	Leu	Leu	Glu	Gln	Leu	Asn	Gln	Pro	Glu	Ala	His	Leu	Tyr	Gln	
										50		55		60		
Ile	Asp	Val	Gln	Ser	Asp	Glu	Glu	Val	Ile	Asn	Gly	Phe	Glu	Gln	Ile	
										65		70		75		80
Gly	Lys	Asp	Val	Gly	Asn	Ile	Asp	Gly	Val	Tyr	His	Ser	Ile	Ala	Phe	
										85		90		95		
Ala	Asn	Met	Glu	Asp	Leu	Arg	Gly	Arg	Phe	Ser	Glu	Thr	Ser	Arg	Glu	
										100		105		110		
Gly	Phe	Leu	Leu	Ala	Gln	Asp	Ile	Ser	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Val	
										115		120		125		
Ala	His	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Met	Pro	Glu	Gly	Gly	Ser	Ile	Val	Ala	
										130		135		140		
Thr	Thr	Tyr	Leu	Gly	Gly	Glu	Phe	Ala	Val	Gln	Asn	Tyr	Asn	Val	Met	
										145		150		155		160
Gly	Val	Ala	Lys	Ala	Ser	Leu	Glu	Ala	Asn	Val	Lys	Tyr	Leu	Ala	Leu	
										165		170		175		
Asp	Leu	Gly	Pro	Asp	Asn	Ile	Arg	Val	Asn	Ala	Ile	Ser	Ala	Gly	Pro	
										180		185		190		
Ile	Arg	Thr	Leu	Ser	Ala	Lys	Gly	Val	Gly	Gly	Phe	Asn	Thr	Ile	Leu	
										195		200		205		
Lys	Glu	Ile	Glu	Glu	Arg	Ala	Pro	Leu	Lys	Arg	Asn	Val	Asp	Gln	Val	
										210		215		220		

整理番号 156216

Glu	Val	Gly	Lys	Thr	Ala	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Asp	Leu	Ser	Ser	Gly
225					230				235				240		
Val	Thr	Gly	Glu	Asn	Ile	His	Val	Asp	Ser	Gly	Phe	His	Ala	Ile	Lys
245					250				255						

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 771 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: Genomic DNA

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

ATGTTAAATC	TTGAAAACAA	AACATATGTC	ATCATGGGAA	TCGCTAATAA	GCGTAGTATT	60
GCTTTTGTTG	TCGCTAAAGT	TTTAGATCAA	TTAGGTGCTA	AATTAGTATT	TACITACCGT	120
AAAGAACGTA	GCCGTAAGA	GCTTGAAAAA	TTATTAGAAC	AATTAAATCA	ACCAGAACCG	180
CACTTATATC	AAATTGATGT	TCARACCGAT	GAAGAGGTAA	TTAATGGTT	TGAGCAATT	240
GCTTAAGATG	TTGGCAATAT	TGATGGTGT	TATCATTCAA	TCGCATTTC	TAATATGGAA	300
GACTTACCGG	GACGCTTTTC	TGAAAATTC	CGTGAAGGCT	TCTTGTAGC	TCAAGACATT	360
AGTTCTTACT	CATTAACAAT	TGTGGCTCAT	GAAGCTAAAAA	AATTAATGCC	AGAAGGTGGT	420
ACCATTTGTTG	CAACAAACATA	TTTAGGTGGC	GAATTCCGAG	TICAAAATT	TAATGTGATG	480
GGTGTGGCTA	AAGCGAGCTT	AGAAGCAAT	GTAAATATT	TAGCAATTAGA	CTTAGGTGCT	540
GATAATATTG	GCGTTAATGC	AATTCAGCT	GGTCCAATCC	GTACATTAAG	TGCCAAAAGGT	600
GTGGGTGGTT	TCAATACAAT	TCTTAAAGAA	ATCGAAGAGC	GTGCACCTTT	AAAACGTAAC	660
GTTGATCAAG	TAGAAGTAGG	AAAAACAGCG	GCTTACTTRT	TAAGTGACTT	ATCAAGTGCG	720
GTTACACGTG	AAAATATTCA	TGTAGATAGC	GGATTCCACG	CAATTAAATA	A	771

登録番号 156216

## What is claimed is:

1. An isolated polynucleotide comprising a member selected from the group consisting of:
  - (a) a polynucleotide having at least a 70% identity to a polynucleotide encoding a polypeptide comprising amino acids 1 to 256 of SEQ ID NO:2;
  - (b) a polynucleotide which is complementary to the polynucleotide of (a); and
  - (c) a polynucleotide comprising at least 15 bases of the polynucleotide of (a) or (b).
2. The polynucleotide of Claim 1 wherein the polynucleotide is DNA.
3. The polynucleotide of Claim 1 wherein the polynucleotide is RNA.
4. The polynucleotide of Claim 2 comprising nucleotide 1 to 771 set forth in SEQ ID NO:1.
5. The polynucleotide of Claim 2 comprising nucleotide encoding the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2.
6. The polynucleotide of Claim 2 which encodes a polypeptide comprising amino acid 1 to 256 of SEQ ID NO:2.
7. An isolated polynucleotide comprising a member selected from the group consisting of:
  - (a) a polynucleotide having at least a 70% identity to a polynucleotide encoding the same mature polypeptide expressed by the cDNA contained in NCIMB Deposit No.40771;
  - (b) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of (a); and
  - (c) a polynucleotide comprising at least 15 bases of the polynucleotide of (a) or (b).
8. A vector comprising the DNA of Claim 2.
9. A host cell comprising the vector of Claim 8.
10. A process for producing a polypeptide comprising: expressing from the host cell of Claim 9 a polypeptide encoded by said DNA.
11. A process for producing a cell which expresses a polypeptide comprising transforming or transfecting the cell with the vector of Claim 8 such that the cell expresses the polypeptide encoded by the cDNA contained in the vector.
12. A polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 70% identical to amino acid 1 to 256 of SEQ ID NO:2.
13. A polypeptide comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2.
16. An antibody against the polypeptide of Claim 12.

登録番号 156216

17. An antagonist which inhibits the activity of the polypeptide of Claim 12.
18. A method for the treatment of an individual having need of FAB I comprising: administering to the individual a therapeutically effective amount of the polypeptide of Claim 12.
- 5 19. The method of Claim 17 wherein said therapeutically effective amount of the polypeptide is administered by providing to the individual DNA encoding said polypeptide and expressing said polypeptide *in vivo*.
- 10 20. A method for the treatment of an individual having need to inhibit FAB I polypeptide comprising: administering to the individual a therapeutically effective amount of the antagonist of Claim 16.
21. A process for diagnosing a disease related to expression of the polypeptide of Claim 12 comprising:
  - determining a nucleic acid sequence encoding said polypeptide.
- 15 22. A diagnostic process comprising:
  - analyzing for the presence of the polypeptide of Claim 12 in a sample derived from a host.
23. A method for identifying compounds which bind to and inhibit an activity of the polypeptide of Claim 12 comprising:
  - contacting a cell expressing on the surface thereof a binding for the polypeptide, said binding being associated with a second component capable of providing a detectable signal in response to the binding of a compound to said binding, with a compound to be screened under conditions to permit binding to the binding; and
  - determining whether the compound binds to and activates or inhibits the binding by detecting the presence or absence of a signal generated from the interaction of the compound with the binding.
- 25 24. A method for inducing an immunological response in a mammal which comprises inoculating the mammal with FAB I, or a fragment or variant thereof, adequate to produce antibody to protect said animal from infection by a staphylococcus.
- 30 25. A method of inducing immunological response in a mammal which comprises, through gene therapy, delivering gene encoding FAB I fragment or a variant thereof, for expressing FAB I; or a fragment or a variant thereof *in vivo* in order to induce an immunological response to produce antibody to protect said animal from disease.
26. An immunological composition which, when introduced into a mammalian host, induces an immunological response in that mammal to a given FAB I polynucleotide

登録番号 156216

or protein coded therefrom, wherein the composition comprises a recombinant FAB I polynucleotide or protein coded therefrom comprising DNA which codes for and expresses an antigen of said FAB I polynucleotide or protein coded therefrom.

Figure 1 [SEQ ID NO:2]

1 MLNLENKTYV IMGLANKRSI AFGVARVLDQ LGAKLWFTYR KERSRKELER  
51 LLEQLNQPBA HLYQIDVQSD EEVINGFEQI GKDVGNIDGV YSTIAFAME  
101 DLRGRFSETS REGFLLAQDI SSYSLTIVAH EAKKLMPPEGG STVATTYLG  
151 EFAVQNYNM GVAKASLEAN VKYLALDLGP DNIRVNAISA GPIRTLSAKG  
201 VGGFNTILKE IEERAPLKRN VDQVEVGKTA AVLLSDLSSG VTGENIKVDS  
251 GEHAIK

登録番号 156216

ページ(2)

## Figure 2 [SEQ ID NO:1]

- 1 ATGTTAAC TCGAAACAA AACATATGTC ATCATGGAA TCGCTAATAA  
 51 GCGTACTATT GCTTTGGGT CGCTTAAGT TTAGATCAA TTAGGTGCTA  
 101 ATTAGTATT TACTTACCGT AAAGAACGTA GCCGTAAGA GCTTGAAAAA  
 151 TTATTAAGAAC AATTAAATCA ACAGAAGCG CACTTATTC AAATTGAGCT  
 201 TCAAAGCGAT GAAGAGCTTA TTATGGTT TGAGCAATT GTAAAGATG  
 251 TGGCAATTAT TGATGCTATA TATCATTCAA TCGCATTTGC TAATATGGAA  
 301 GACTTACGCC GACGCTTTC TGAACCTCA CGTGAAAGCT TGTTGTTAGC  
 351 TCAAGACATT AGTTCTTACT CATDAACAT TGTGGCTCAT GAAGCTAAAA  
 401 ATTAATGCC AGAAGCTGGT AGCATTTGGT CAACACATA TTAGGGTGGC  
 451 GATTCCGAG TTCAAAATTA TAATGTGATG GGTGTGCTA AAGCGAGCTT  
 501 AGAAGCAAT GTAAATATT TAGCATTAGA CTAGGTGCTT GATAATATTG  
 551 GCGTAAATGC AATTTCAGCT CCTCCAAATTC GTACATTAAG TCAAAAGGT  
 601 GTGGCTGCTT TCAATACAAAT TCCTAAAGAA ATCGAAGAGC GTGCACCTT

## FIGURE 2A

651 AAAACGTAAC GTTGTCAAG TAGAAGTAGG TAAACAGCC GCTTACTTT  
701 TAAGTCACTT ATCAAGTGGC CTTACAGGT AAAATATTCA TGTAGATAGC  
751 GGATTCCACG CAATTAAATA A

## ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

Prokaryotic FAB I polypeptides and DNA (RNA) encoding such FAB I and a procedure for producing such polypeptides by recombinant techniques is disclosed. Also disclosed are methods for utilizing such FAB I for the treatment of infection, such as bacterial infections. Antagonists against such FAB I and their use as a therapeutic to treat infections, such as staphylococcal infections are also disclosed. Also disclosed are diagnostic assays for detecting diseases related to the presence of FAB I nucleic acid sequences and the polypeptides in a host. Also disclosed are diagnostic assays for detecting polymyxin antibiotics encoding FAB I and for detecting the polypeptide in a host.